

Miklán Zsanett

**Tumor ellenes hatóanyagok konjugátumai
sejtpenetráló és célba juttató peptidekkel:
Szintézis, kémiai és *in vitro* biológiai jellemzés**

Doktori értekezés

Témavezető:

Dr. Hudecz Ferenc egyetemi tanár

ELTE Kémiai Intézet

ELTE Kémia Doktori Iskola

Vezető: Dr. Inzelt György egyetemi tanár

Szintetikus kémia, anyagtudomány, biomolekuláris kémia

programvezető: Dr. Horváth István Tamás egyetemi tanár

ELTE-MTA Peptidkémiai Kutatócsoport

Budapest

2009

Köszönetnyilvánítás

Először szeretném megköszönni Dr. Hollósi Miklós akadémikus, egyetemi tanárnak, és Dr. Hudecz Ferenc egyetemi tanárnak, az ELTE-MTA Peptidkémiai Kutatócsoport vezetőjének, az Eötvös Loránd Tudományegyetem rektorának, hogy doktori kutatómunkámat a Szerves Kémiai Tanszéken működő kutatócsoportban végezhettem.

Dr. Hudecz Ferenc témavezetőmnek nagyon köszönöm a hasznos beszélgetéseket, melyek során tanácsaival és észrevételeivel segítette munkámat. Iránymutatásaival hozzájárult a kutatás során kapott eredmények tudományos közléséhez és PhD dolgozatom elkészítéséhez is.

Köszönet illeti Dr. Mező Gábor tudományos tanácsadót, aki egyetemi és doktori éveim alatt megosztotta velem értékes tudását a peptidkémia területén, és Dr. Magyar Anna tudományos főmunkatársat, aki a peptidkémiaiban is hasznos szerves kémiai tapasztalatait adta át érthetően és türelmesen. Örömmel fogadtam meg mindkettőjük tanácsait.

Köszönöm Dr. Bánóczi Zoltán tudományos munkatársnak, hogy a peptidkémia területén tett első lépéseimet saját doktori kutatásai mellett is felügyelte. Labortársként később is támaszkodhattam segítségére.

Köszönettel tartozom Dr. Reményi Judit, Oláhné Dr. Szabó Rita tudományos segédmunkatársaknak és Orbán Erika doktorandusz hallgatónak a biológiai mérések elvégzéséért és azért, hogy szakmai beszélgetések során segítettek a biológiai összefüggések megértésében. Dr. Reményi Judit ismertette meg velem a sejtek kezelésének módját is, amiért külön köszönet illeti.

Köszönöm Medzihradszky Dr. Schweiger Hedvig ny. címzetes docensnek, Dr. Bősze Szilvia tudományos főmunkatársnak és a mikroanalitikai labor munkatársainak a különböző mikroanalitikai mérések, aminosav- és elemanalízis vizsgálatok elvégzését.

Több kollégának is köszönettel tartozom a tömegspektrometria mérések elvégzéséért.

Dr. Schlosser Gitta, Dr. Bánóczi Zoltán, Dr. Horváti Kata tudományos segédmunkatársaknak és Dr. Bai Katalin Boglárka kollégámnak köszönöm meg, hogy saját munkájuk végzése mellett is volt idejük a tömegspektrumok felvételére.

Köszönöm Dr. Sztaricskai Ferenc professzornak, a Debreceni Egyetem Gyógyszerészeti Kémiai Tanszékén működő Antibiotikum-kémiai Kutatócsoport vezetőjének, Dr. David Andreu professzornak, a barcelonai Pompeu Fabra Egyetemen működő Proteomika és

Fehérje Kémiai Csoport (Proteomics and Protein Chemistry Unit) vezetőjének és Dr. Tűros György adjunktusnak, hogy egy-egy résztémán belül szakmai tanácsaikkal támogatták munkámat és laboratóriumaikban tanulhattam.

Köszönet illeti az ELTE-MTA Peptidkémiai Kutatócsoport minden tagját, akikhez bármikor fordulhattam kérdéseimmel, és akik jelenlétükkel hozzájárultak a mindennapi jó hangulat megteremtéséhez. Köszönet ezért az eddig még nem említett Dr. Uray Katalin tudományos főmunkatársnak és Dr. Bartos Ádám kollégának, valamint itt emelném ki Gali Irén laboráns segítségét is, akihez azután is fordulhattam, hogy befejeztem munkámat a kutatócsoportban.

Köszönöm családom és barátaim támogatását, kedvesem mindennapi segítségét és türelmét, amivel hozzájárultak doktori munkám sikeres befejezéséhez.

Végül szeretnék köszönetet mondani az anyagi támogatásért a Doktori Iskolának, alapítványoknak és utazást támogató szervezeteknek. Az ELTE TTK Kémiai Doktori Iskola biztosított számomra három éves ösztöndíjat, majd a Richter Centenárium Alapítvány még félévnyi lehetőséget teremtett kutatásaim befejezéséhez. Köszönöm az Alapítvány a Magyar Peptid- és Fehérjekutatásért alapítványnak, hogy támogatták konferenciákon és munkabizottsági üléseken való részvételemet. Köszönöm az NKTH (TÉT magyar-spanyol E-32/2004) segítségét, amely lehetővé tette, hogy spanyol tanulmányúton vehettem részt két alkalommal is. Ezen kívül megköszönöm az OTKA (TS44742, K68285), az ETT (544/2003), az NKFP (Medichem 2 1A005/04), valamint a GVOP (3.2.1-2004-04-0005/3.0, 3.2.1-2004-04-0352/3.0) anyagi támogatását is.

Rövidítésjegyzék

AA	amino acid (aminosav)
ACN	acetonitril
AcOH	ecetsav
Alexa488	zölden fluoreszkáló festék molekula (~ fluoreszcein)
Boc-	<i>tert</i> -butiloxikarbonil-
BOP	benzotriazol-1-iloxitrisz(dimetilamino)-foszfónium
hexafluorofoszfát	
ClAc-	klóracetil-
Dau	daunomicin
Dau-□-Arg _n -NH ₂	daunomicinil-oligoarginil-négyszögsav diamid (3-daunomicin-4-oligoarginin-3-ciklobutén-1,2-dion)
Dau-□-Arg-OH	daunomicinil-arginil-négyszögsav diamid (3-daunomicin-4-arginin-3-ciklobutén-1,2-dion)
Dau-□-OH	daunomicinil-négyszögsav monoamid (3-daunomicin-4-hidroxi-3-ciklobutén-1,2-dion)
Dau-□-OMe	daunomicinil-négyszögsav metilészter monoamid (3-daunomicin-4-metoxi-3-ciklobutén-1,2-dion)
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undek-7-én
DCC	<i>N,N'</i> -diciklohexil-karbodiimid
DCM	diklórmétán
DIC	<i>N,N'</i> -diizopropil-karbodiimid
DIEA	<i>N</i> -diizopropil-etil-amin
DMF	dimetil-formamid
DMSO	dimetil-szulfoxid
DNS	dezoxi-ribonukleinsav
EDT	etánditiol
FACS	Fluorescent-Activated Cell Sorting (flow cytometry) (Fluoreszcensen Aktivált Sejt Válogatás (áramlási citometria))
Fc	ferrocén
FCS	fetal calf serum (borjú magzat szérum)

Fmoc-	9-fluorenil-metiloxikarbonil-
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography (Gyors Fehérje Folyadékkromatográfia)
HBTU	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametilurónium hexafluorofoszfát
HEPES	4-(2-hidroxietil)-1-piperazin-etánszulfonsav (puffer készítésére)
HepG2	humán hepatoma sejtvonal
HL-60	humán leukémia sejtvonal
HO-□-OH	négyszögsav (3,4-dihidroxi-3-ciklobutén-1,2-dion)
HOBt	1-hidroxi-benzotriazol
IC ₅₀	50% inhibition concentration (az a kezelési koncentráció, ahol a kezelt sejtek 50%-a elpusztul)
MEND	Multifunctional Envelope-type Nano-Device (Többfunkciós boríték-típusú nano-eszköz – DNS hordozására)
MeO-□-OMe	négyszögsav-dimetilészter (3,4-dimetoxi-3-ciklobutén-1,2-dion)
MeOH	metanol
MRI	Magnetic Resonance Imaging (Mágneses Rezonancia Képalkotás)
MS	Mass Spectrometry (Tömegspektrometria)
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium bromid
NCI-H358	nem-kis sejtés tüdő karcinóma sejtvonal
NMM	<i>N</i> -metil-morfolin
OD	optical density (optikai sűrűség)
PAD	pro-apoptotic domain (apoptózis indukáló peptid)
Pbf-	2,2,4,6,7-pentametil-benzofurán-5-szulfonil-
Pem	pemetrexed
Rink Amide MBHA	Rink Amid metil-benzhidril-amin gyanta
RNS	ribonukleinsav
RP-HPLC	Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography (Fordított Fázisú Nagy Hatékonyságú Folyadékkromatográfia)
RPMI-1640	sejtek fenntartására használt médium, aminosavakat és vitaminokat tartalmaz dikarbonát pufferben
R _t	retenciós idő
SELDI-TOF	Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight
SEND	Surface Enhanced Neat Desorption
SOCl ₂	tionil-klorid

^t Bu-	<i>terc</i> -butil-
TBTU	<i>O</i> -(benzotriazol-1-il)- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametilurónium tetrafluoroborát
TEA	trietyl-amin
TFA	trifluor-ecetsav
TriszHCl	trisz-(hidroximetil)-amino-metán-hidroklorid (2-amino-2-hidroximetil-1,3-propándiol-hidroklorid)
Trt-	tritol-csoport-
UV	ultraviola
λ	lambda, hullámhossz

Az aminosavak egy- illetve hárombetűs rövidítéseit a Journal of Peptide Science 5: 465-471 (1999) „A short guide to abbreviations and their use in peptide science” ajánlása szerint használtam.

Tartalomjegyzék

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	3
RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK	5
TARTALOMJEGYZÉK	9
1. BEVEZETÉS	13
1.1. TUMOR ELLENES HATÓANYAGOK	15
1.1.1. FERROCÉN ÉS FERROCÉN-KONJUGÁTUMOK	15
1.1.2. DAUNOMICIN ÉS DAUNOMICIN-KONJUGÁTUMOK	20
1.1.3. PEMETREXED	23
1.2 PEPTID HORDOZÓK.....	25
1.2.1. SEJTPENETRÁLÓ OLIGOARGININEK	25
1.2.2. TÜDŐ SPECIFIKUS IELLQAR PEPTID	27
CÉLKITÚZÉSEK	29
3. KÍSÉRLETI RÉSZ	31
3.1. ANYAGOK	31
3.2. FERROCÉN TARTALMÚ PEPTIDKONJUGÁTUMOK ELŐÁLLÍTÁSA	33
3.2.1. OLIGOARGININ PEPTIDEK SZINTÉZISE	33
3.2.2. FERROCÉN-KARBONSAV ÉS FERROCÉN-AKRILSAV PEPTIDKONJUGÁTUMAINAK ELŐÁLLÍTÁSA SZILÁRDFÁZISON	33
3.2.3. FERROCÉN-AKRILSAV PEPTIDKONJUGÁTUMAINAK ELŐÁLLÍTÁSA OLDATBAN	34
3.2.4. OLIGOARGININ PEPTIDEK ÉS FERROCÉN TARTALMÚ PEPTIDKONJUGÁTUMOK TISZTÍTÁSA	34
3.3. DAUNOMICIN PEPTIDKONJUGÁTUMOK ELŐÁLLÍTÁSA.....	37
3.3.1. AMINOOXI-CSOPORTOT TARTALMAZÓ OLIGOARGININ PEPTIDEK SZINTÉZISE ÉS TISZTÍTÁSA	37
3.3.2. HIDRAZID-CSOPORTOT TARTALMAZÓ OLIGOARGININ PEPTIDEK SZINTÉZISE ÉS TISZTÍTÁSA, AZ FMOC-GLU- OME AMINOSAV SZINTÉZISE.	37
3.3.3. DAUNOMICINIL-ARGINIL-NÉGYSZÖGSAV DIAMID ELŐÁLLÍTÁSA ÉS TISZTÍTÁSA	38

Tartalomjegyzék

3.3.4. NÉGYSZÖGSÁV LINKERT TARTALMAZÓ DAUNOMICIN KONJUGÁTUMOK ELŐÁLLÍTÁSA ÉS TISZTÍTÁSA	39
3.3.5. OXIM KÖTÉST TARTALMAZÓ DAUNOMICIN KONJUGÁTUMOK ELŐÁLLÍTÁSA	40
3.3.6. HIDRAZON KÖTÉST TARTALMAZÓ DAUNOMICIN KONJUGÁTUMOK ELŐÁLLÍTÁSA	40
3.3.7. DAUNOMICIN–OLIGOARGININ KONJUGÁTUMOK TISZTÍTÁSA	41
3.3.8. DAUNOMICIN-OLIGOARGININ KONJUGÁTUMOK STABILITÁSÁNAK VIZSGÁLATA	41
3.4. PEMETREXED PEPTIDKONJUGÁTUMOK ELŐÁLLÍTÁSA	43
3.4.1. CISZTEIN TARTALMÚ OLIGOARGININ ÉS IELLQAR PEPTIDEK SZINTÉZISE ÉS TISZTÍTÁSA	43
3.4.3. KLÓRACETILEZETT PEMETREXED-DIMETILÉSZTER SZINTÉZISE ÉS TISZTÍTÁSA	43
3.4.4. PEMETREXED-DIMETILÉSZTER PEPTIDKONJUGÁTUMAINAK ELŐÁLLÍTÁSA ÉS TISZTÍTÁSA	45
3.4.5. PEMETREXED PEPTIDKONJUGÁTUMAINAK ELŐÁLLÍTÁSA A METILÉSZTEREK ELTÁVOLÍTÁSÁVAL ÉS TISZTÍTÁSUK	45
3.6. PEPTIDEK ÉS PEPTIDKONJUGÁTUMOK ANALITIKAI JELLEMZÉSE – MÓDSZEREK	47
3.6.1. ANALITIKAI FORDÍTOTT FÁZISÚ NAGY HATÉKONYSÁGÚ FOLYADÉK KROMATOGRÁFIA (RP-HPLC)	47
3.6.2. TÖMEGSPEKTROMETRIA	48
3.7. PEPTIDKONJUGÁTUMOK BIOLÓGIAI JELLEMZÉSE – MÓDSZEREK.....	49
3.7.1. TUMORELLENES HATÓANYAGOT TARTALMAZÓ SZÁRMAZÉKOK CITOSZTATIKUS HATÁSÁNAK MEGHATÁROZÁSA <i>IN VITRO</i>	49
3.7.2. TUMORELLENES HATÓANYAGOT TARTALMAZÓ SZÁRMAZÉKOK SEJTBE JUTÁSI KÉPESSÉGEINEK MEGHATÁROZÁSA <i>IN VITRO</i>	50
<u>4. EREDMÉNYEK</u>	<u>51</u>
4.1. FERROCÉN TARTALMÚ PEPTIDKONJUGÁTUMOK SZINTÉZISE ÉS <i>IN VITRO</i> CITOSZTATIKUS HATÁSA	51
4.1.1. A KONJUGÁTUMOK SZINTÉZISE	51
4.1.2. A KONJUGÁTUMOK CITOSZTATIKUS HATÁSA HUMÁN LEUKÉMIA (HL-60) SEJTEN	53
4.2. DAUNOMICIN PEPTIDKONJUGÁTUMOK SZINTÉZISE ÉS <i>IN VITRO</i> CITOSZTATIKUS HATÁSA	57
4.2.1. NÉGYSZÖGSÁV LINKERT TARTALMAZÓ DAUNOMICIN KONJUGÁTUMOK SZINTÉZISE	57
4.2.2. OXIM- VAGY HIDRAZON-KÖTÉST TARTALMAZÓ DAUNOMICIN KONJUGÁTUMOK SZINTÉZISE	60
4.2.3. DAUNOMICIN PEPTIDKONJUGÁTUMOK TISZTÍTÁSA	64
4.2.4. DAUNOMICIN PEPTIDKONJUGÁTUMOK STABILITÁSA OLDATBAN ÉS SZILÁRD ÁLLAPOTBAN	64
4.2.5. DAUNOMICIN PEPTIDKONJUGÁTUMAINAK CITOSZTATIKUS HATÁSA ÉS SEJTBE JUTÁSI KÉPESSÉGE HUMÁN LEUKÉMIA (HL-60) SEJTEN	65
4.3. PEMETREXED PEPTIDKONJUGÁTUMOK	69
4.3.1. PEMETREXED SZÁRMAZÉKOK SZINTÉZISE	69
4.3.2. PEMETREXED-DIMETILÉSZTER PEPTIDKONJUGÁTUMAINAK SZINTÉZISE	70

4.3.3. PEMETREXED PEPTIDKONJUGÁTUMOK SZINTÉZISE	72
4.3.4. PEMETREXED PEPTIDKONJUGÁTUMOK CITOSZTATIKUS HATÁSA HUMÁN LEUKÉMIA (HL-60) SEJTEKEN	73
5. ÖSSZEFOGLALÁS	75
5.1. FERROCÉNT TARTALMAZÓ PEPTIDKONJUGÁTUMOK	75
5.2. DAUNOMICIN PEPTIDKONJUGÁTUMOK.....	76
5.3. PEMETREXED PEPTIDKONJUGÁTUMOK	77
6. IRODALOMJEGYZÉK	79
7. ÖSSZEFOGLALÓ	89
8. ABSTRACT	91

1. Bevezetés

A kemoterápia kifejezést általános értelemben minden olyan esetben használhatjuk, ahol kémiai szereket, különböző vegyületeket gyógyításra használunk. Napjainkban azonban a kemoterápia szót elsősorban a rákos betegségek kezelésére alkalmazott eljárással azonosítják. Ha valaki „kemót kap” vagy „kemóra jár”, akkor tudhatjuk, hogy valamilyen daganatos betegséggel küzd. A kemoterápia fogalma beépült a köztudatba. Nincs olyan család vagy közösség, amely ne lenne érintett valamilyen formában.

A rák gyógyítására nincs általánosan alkalmazható gyógy mód. Mivel a „rák” sokféle betegség gyójtőneve kezelése során is többféle lehetőség felmerülhet. Különbözö változatai ellen változatos szerkezetű és hatásmechanizmusú hatóanyagokkal vesszük fel a harcot. Ma is vannak azonban még gyógyíthatatlan esetek, ahol az emberi tragédiát csak késleltetni tudjuk. Ezért az új gyógy szerek kifejlesztése még mindig kiemelt feladat.

Előfordulhat, hogy a gyógy szergyárak hatalmas molekula adatbázisából vagy kutató csoportok munkája nyomán egy teljesen új típusú, hatásos vegyület kerül elő. Ez azonban ritkán történik meg. Legtöbbször a már ismert hatóanyagokat módosítjuk, hogy ezzel javítsuk, új tulajdonságokkal ruházzuk fel, szélesebb hatásúvá vagy éppen specifikusabbá tegyük azokat. A vegyület szerkezetében történő kisebb változtatásokkal az eredeti molekula analógjait állíthatjuk elő. A módosított vegyület sokszor hatásosabb az eredetinel: hatékonyabb a betegséggel szemben vagy kevésbé súlyos mellékhatásokkal rendelkezik.

Ha a hatóanyag szerkezetének módosítása helyett egy másik, eltérő tulajdonságokkal rendelkező vegyületet kapcsolunk a molekulához, konjugátumot állíthatunk elő. A konjugátum egyik tagja lehet „hordozó”, amihez több hatóanyag molekulát is kapcsolhatunk. Biokonjugátumról akkor beszélünk, ha az összekapcsolt vegyületek mindegyike rendelkezik valamilyen biológiai aktivitással és ezt a tulajdonságukat a konjugálás, a kovalens kémiai kötés kialakítása után is megőrzi. Ezzel a módszerrel a különböző molekulák hatását kombinálhatjuk, az eredeti hatóanyag tulajdonságait bővíthetjük. Megváltoztathatjuk a molekula fizikai-kémiai és/vagy biológiai sajátosságait. Sok lehetőségünk van. Egy egyszerű hordozó molekula alkalmazásával is javíthatunk a hatóanyag kezelhetőségén, például a stabilitás vagy a vízoldhatóság növelésével. Késleltetett hatást is kiválthatunk, amennyiben az aktív molekula felszabadulása után

jelentkezik csak a biológiai hatás. A hordozó molekulák azonban más tulajdonságokkal is rendelkezhetnek. A hatóanyagot speciális hordozó molekulákkal célba juttathatjuk, például egy szerv- vagy szövet-specifikus receptor jelenlétének lehetőségeit kihasználva. Nagy molekula tömegű vagy speciális, sejtpenetráló tulajdonságú hordozó alkalmazásával új transzlokációs utat nyithatunk, ami a hatóanyagra rezisztens tumor sejtek esetében is hatásos kombinációhoz vezethet.

A hatékony hordozó molekulák kötőhellyel rendelkező, nem toxikus, szervezetben könnyen lebomló és onnan kiürülő, valamint az előző példákban felsorolt tulajdonságokhoz hasonló kedvező sajátságokkal rendelkező molekulák. Egy hatóanyag hordozóhoz való kapcsolása előtt mérlegelnünk kell, hogy a hatás megőrzése mellett a molekula mely részei módosíthatók, milyen funkciós csoportokat használhatunk a konjugáláshoz és melyek jelenléte elengedhetetlen a biológiai aktivitás megőrzéséhez.

Munkám során különböző típusú tumor ellenes hatással rendelkező hatóanyag molekulákat (ferrocén származékok, antraciklin vegyület, folsav antagonistá vegyület) és különböző hosszúságú sejtpenetráló tulajdonsággal rendelkező oligoarginin hordozó peptideket kapcsoltam össze, különböző kémiai kötések alakítottam ki változatos kémiai stratégiákkal. A konjugátumok analitikai jellemzésével, kémiai és biológia tulajdonságaik vizsgálatával kívántam a célkitűzésekben szereplő kérdésekre választ találni.

1.1. Tumor ellenes hatóanyagok

A tumor ellenes hatóanyagoknak többféle fajtája létezik. Legtöbb esetben az aktív molekula a sejtosztódás vagy a DNS szintézis bizonyos szakaszában képes hatni. Aktivitásuk a sejtciklushoz kötött és elsősorban a gyorsan osztódó sejtek pusztítására képesek, így a gyorsan szaporodó tumor sejtek ellen hatásosak. Mivel szervezetünknek vannak egészséges, gyorsan osztódó sejtjei is – pl. a hajhagymák, a gyomor-bél rendszer és az immunrendszer sejtjei – a tumor ellenes szerek ezeket is könnyen károsíthatják, ami mellékhatások kialakulásához vezet. Így működnek például az alkilező szerek, az antimetabolitok, az antraciklinek, az alkaloidok, vagy a topoizomeráz enzim gátló vegyületek. Mellékhatásaik csökkentése vagy kiküszöbölése a betegek életminőségének javítása szempontjából nagyon fontos, ezért fejlesztésük továbbra is a rák ellen küzdő kutató vegyészek és biológusok elsődleges feladatai közé tartozik.

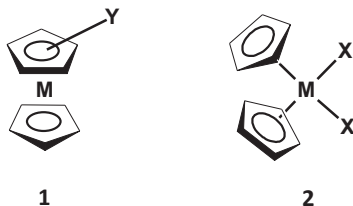
Munkámhoz a fent felsorolt csoportokból választottam három reprezentatív vegyületet: az antimetabolitok közé tartozó, folsav antagonistá pemetrexedet; az antraciklin családba tartozó daunomicint; és a ferrocén egységet tartalmazó, változatos hatásmechanizmussal rendelkező hatóanyagokat mintázó ferrocén-karbonsavat és ferrocén-akrilsavat.

1.1.1. Ferrocén és ferrocén-konjugátumok

A szervetlen és fémorganikus vegyületek biológiai hasznosítása a ciszplatina $[Pt(NH_3)_2Cl_2]$ tumorelles hatásának felfedezése (1) után indult el és napjainkra a rák elleni küzdelem egyik fontos kutatási területévé vált. A metallocének a fémorganikus vegyületek egyik érdekes és biológiailag is hasznosítható csoportja. Ezek a +2 vagy +4 vegyérték állapotú átmenetifém iont tartalmazó vegyületek elektronosan semlegesek. A központi iont két ciklopentadienil gyűrű (+2 vegyértékállapot) vagy két ciklopentadienil gyűrű és két halogén vagy pszeudohalogén ligandum (+4 vegyértékállapot) veszi körül (1. ábra). Kicsi, merev, hidrofób molekulák, melyek diffúzióval könnyen átjutnak a sejtmembránon. Felszínük a ciklopentadienil ligandumoknak köszönhetően hasonlít egy aromás gyűrűre, de térigényük nagyobb. Mivel a szorosan kötött központi ion jól nyomon követhető (például radioaktivitás alapján), a metallocének segítségével a sejtekben végbemenő folyamatok tanulmányozására nyílik mód *in vitro* és *in vivo* körülmények

között. Tulajdonságaik kedveznek különböző diagnosztikai eljárások (2), immunkémiai analízis módszerek (3) kidolgozásához, valamint a sejtbeli enzimek/receptorok működésének tanulmányozásához (4-6). Találhatunk e vegyületcsoportban tumorelles szereket (7, 8) és antibiotikumokat is (9).

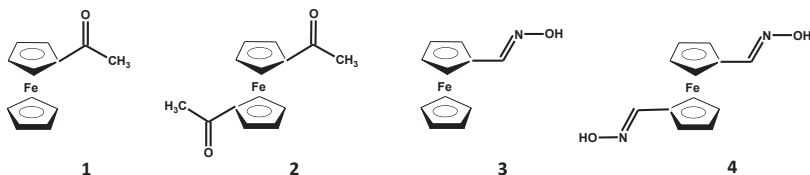
1. ábra Metallocének főbb csoportjai



Metallocének (1) és metallocén halogenidek (2), M = átmenetifém ion

A ferrocén a metallocének egyik alapvegyülete. Származékaival az 1980-as évek óta foglalkoznak. Bár biológiai hatásuk sokrétű lehet, mégis legtöbb irodalmi utalás tumorelles adottságokkal rendelkező ferrocén származékok előállításáról számol be. Valóban, mára több ferrocént tartalmazó vegyületről kiderült, hogy *in vitro* tumorelles hatással rendelkezik. Az irodalom tanulmányozása azt mutatja, hogy a ferrocén származékok hatásmechanizmusa erősen függ a ciklopentadienil gyűrű szubsztituenseinek minőségétől. Acetil- és karboxaldoxim-származékokat (2. ábra) vizsgálva azt találták, hogy ezek a vegyületek a topoizomeráz II enzim működését befolyásolják (10).

2. ábra Topoizomeráz II gátló ferrocén származékok

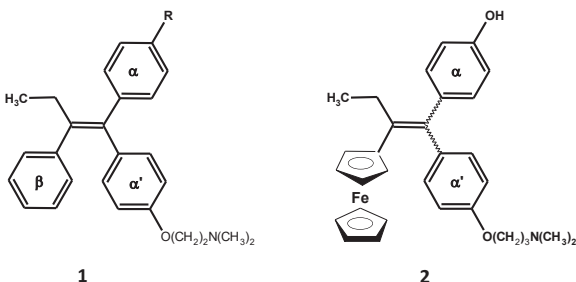


Monoacetil-ferrocén (1), diacetil-ferrocén (2), ferrocén-monokarboxaldoxim (3),
ferrocén-dikarboxaldoxim (4)

Ez az enzim, mely a DNS replikáció, transzkripció és rekombináció során jut szerephez, több tumorelleses szer fő támadáspontja is (például etoposid, teniposid, m-AMSA, adriamicin, daunorubicin, mitoxantron). Ferricénium sók vizsgálata során kimutatták, hogy ezek az ionos vegyületek aktív oxigén specieszeket generálnak, amelyek károsítják a DNS szerkezetét és a rákos sejt apoptózisát válthatják ki (11, 12).

Tamoxifen, az ismert, emlődagánat ellen alkalmazott ösztrogén antagonistá, ferrocénnel való módosításával (3. ábra) olyan új vegyületet is előállítottak, amely az antagonistá hatás mellett citotoxikus aktivitással is rendelkezik (13).

3. ábra Tamoxifen származékok



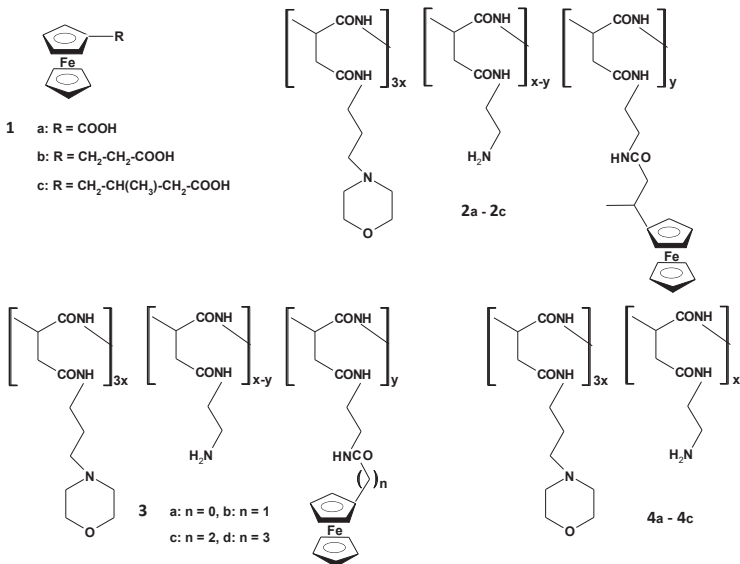
Tamoxifen (1, R = H), 4-hidroxi-tamoxifen (1, R = OH), ferrocén származék (2)

Az új vegyület a tamoxifenre rezisztens emlő tumorsejtek ellen is hatásosnak bizonyult. Érdemes megjegyezni, hogy működési mechanizmusa még nem tisztázott.

A ferrocén származékok mellett az alapvegyület esetében mérhető *in vitro* hatást nem észleltek. Mind a ferrocén, mind jónéhány ferrocén származék esetében is problémát jelent a korlátozott vízoldhatóság. Ennek kiküszöbölésére előállítottak például vízoldható ferrocén-ciklodextrin komplexet vagy különböző ferrocén-karbonsavakat kapcsoltak vízoldható aszparaginsavból álló polimerhez (4. ábra). Megfigyelték, hogy a konjugálás hatására nemcsak a vegyületek oldékonysága lett magasabb, de az antiproliferatív aktivitás számos tumor sejtvonalon jelentősen nőtt (pl. EMT-6, HeLa, LNCaP, Caco-2). Ebből arra következtethetünk, hogy az ígéretes ferrocén származékok fizikai-kémiai illetve biológiai tulajdonságainak javítására hatásos módszer lehet a peptid hordozókhoz való kapcsolás (14, 15).

Ferrocént tartalmazó peptidek és peptidkonjugátumok szintézise többféleképpen valósítható meg (1. táblázat) (16, 17). Folyadékfázisban peptidek *N*-terminálisára szabad karbonsav-csoporttal rendelkező származékokat kapcsoltak különböző módszerekkel. A karbonsav származékot halogenid (18-20) vagy észter formában (21-23) aktiválvaadták a peptidhez, illetve *in situ* aktiválást is alkalmaztak HBTU vagy TBTU kapcsolószerrel segítségével (24). Ferrocenil-karboxil-aldehidből „one-pot” reakcióban (25) és ferrocenil-etil-maleimidból tioéter kötés kialakításával állítottak elő ferrocén-konjugátumokat (26). Ferrocén oldallánccal rendelkező aminosavakat peptidekbe építettek folyadékfázisú vagy szilárdfázisú peptidszintézis módszerekkel, Fmoc/^tBu vagy Boc/Bzl technikát alkalmazva (27-30).

4. ábra Ferrocént tartalmazó peptidkonjugátumok



Szabad ferrocén vegyületek (1a-1c), polimer hordozók (4a-4c) és konjugátumok (2a-2c és 3a-3d)

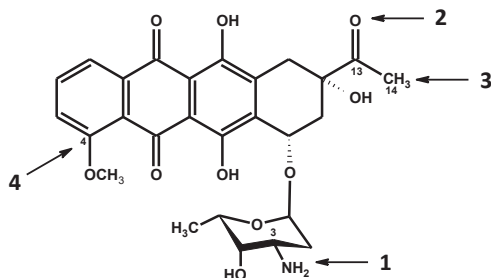
1. táblázat Irodalmi példák ferrocént tartalmazó peptidek és peptidkonjugátumok szintézisére

Ferrocén-származék	Reakciópartner	Kialakult kötés	Hivatkozás
<i>Folyadékfázisú szintézisek</i>			
Ferrocén-karbonsavak	aminosavak dipeptidek oligoprolin peptidek poliaszparaginsav-származékok	amid kötés	(14, 15, 21-24, 31)
1,1'-Ferrocén-dikarbonsavklorid	aminosavak dipeptidek	amid kötés	(18-20)
Ferrocenil-aldehid	aminosavak dipeptidek tripeptidek	ferrocén-metil-származékok	(25)
N-(2-ferrocén-etil)-maleimid	glutacion fehérjék	tioéter kötés	(26)
1'-aminoferrocén-1-karbonsav	tetrapeptid	amid kötés	(32)
Ferrocén-akrilsav	oligoarginin (R₆, R₈)	amid kötés	(33)
<i>Szilárdfázisú szintézisek</i>			
Ferrocenil-alanin Ferrocenil-fenilalanin	Enkefalin Bradikinin Substance P	amid kötés Boc/Bzl technika	(27-29)
Ferrocén-karbonsav	Kollagén	amid kötés Fmoc/ ^t Bu technika	(30)
Ferrocén-karbonsav	oligoarginin (R₄, R₆, R₈) TRGRSRGRSGR	amid kötés Boc/Bzl és Fmoc/^tBu technika	(33)

1.1.2. Daunomicin és daunomicin-konjugátumok

A daunomicin (daunorubicin) antraciklin típusú antibiotikum, amit először a *Streptomyces peucetius* baktériumból izoláltak. Rákos betegek, elsősorban speciális leukémiák (például akut mieloid leukémia, akut limfoid leukémia) illetve neuroblasztoma gyógyítására alkalmazzák. A ráksejtek számának növekedését a szervezetbe kerülve a DNS és RNS szintézisének gátlásával éri el. Diffúzióval jut a sejtekbe, ahol a DNS kettős spiráljának két lánc közé ékelődik, ezzel megakadályozva a sejtosztódást. Ugyanakkor gátolja a DNS replikációban részt vevő Topoisoméráz II enzim működését is (34, 35). Hatékonyságát, klinikai alkalmazását azonban korlátozzák a kezelés során fellépő mellékhatások (immunszuppresszió, neurotoxicitás, kardiotoxicitás) és a ráksejteknek kialakuló daunomicin-rezisztencia (36-38).

5. ábra Daunomicin kémiai szerkezete és a lehetséges kötőhelyek



3-daunozamino-csoport (1), 13-oxo-csoport (2), 14-metil-csoport (3), 4-metil-éter-csoport (4)

A mellékhatások kiküszöbölése régóta foglalkoztatja a kutatókat. A hetvenes évektől kezdve különböző módosításokat hajtottak végre a molekula szerkezetén, analógokat állítottak elő [adriamicin (doxorubicin), epirubicin, idarubicin]; illetve a daunomicint hordozó molekulákhoz kapcsolva igyekeztek javítani az eredeti vegyület biológiai tulajdonságain. A hordozó molekulák között sokféle vegyülettípus található: oligo- és polipeptidek (39), fehérjék (40), poliszacharidok (41), szintetikus polimerek (42, 43), dextrán (44). A daunomicin-konjugátumok irodalma rendkívül gazdag. Kémiai módszerek sokféleségére volt szükség ahhoz, hogy a daunomicint ezekhez a hordozókhoz

konjugálhassák. A molekula négy olyan funkciós-csoporttal is rendelkezik, ami kovalens konjugálásra alkalmas (5. ábra).

Leggyakrabban a szénhidrát rész primer amino-csoportját használják fel a kötés kialakításához, annak ellenére, hogy a szabad amino-csoport jelenléte elengedhetetlen a daunomicin DNS-kötő képességének és biológiai aktivitásának megőrzéséhez (45). Az amino-csoport csak akkor használható konjugáláshoz, ha van esély arra, hogy egy célsejtben a hordozóról leszakadva felszabadul. Az első konjugálásokat glutáraldehiddel és perjodát-oxidációval, illetve *m*-maleimidobenzoi-*N*-hidroxiszukcinimid észterrel végezték (40). A maleimid linkert azóta is többször alkalmazták (46-48). Aminosavak vagy peptidek kapcsolásánál gyakran egyszerű amid kötést alakítanak ki, mivel ezt a kötést lizoszómális (40, 49, 50) vagy szerv-specifikus enzimek (51) hasítani tudják. Savra érzékeny kötés kialakításával a hatóanyag már savas körülmények között is felszabadul (például a lizoszóma belsejében). Cisz-akinitil (52, 53), szukcinil (54, 55), változtatós dikarbonsav linkereket (56) és dimetil-maleinsav anhidridet is alkalmaztak erre a célra (43). Számos speciális konjugátumot is előállítottak az amino-csoport módosításával, például formaldehid (57), ösztrogén (58), négyszögsav-amid (59) és karbamát (60) származékokat. Több példát találunk az irodalomban a daunomicin 13-oxo-csoportjának módosítására is, melynek során sikerrel szintetizáltak hidrazid (46, 48, 61, 62) és különböző O-alkil-hidroxilamin (61, 63) származékokat. A 4-metil-éter csoporthoz oligonukleotidokat kapcsoltak (64), illetve a daunomicin 14-bróm származékának felhasználásával, észter vagy tioéter kötés kialakításával konjugátumokat is szintetizáltak (65, 66). A daunomicin konjugátumok szintézisére alkalmazott reakciópartnerekre és a kialakult kötések sokféleségére példák a 2. táblázatban találhatók.

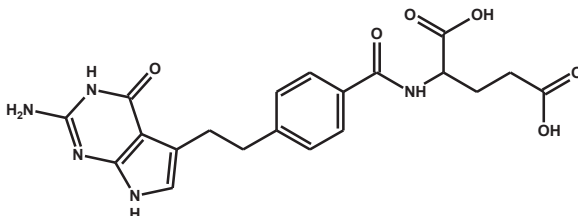
2. táblázat Irodalmi példák daunomicin konjugátumok szintézisére

Reakciópartner	Linker	Kialakult kötés	Hivatkozás
D-Me ₂ Gly D-Me ₂ Gly ₂ D-Pr ₂ Gly	-	amid kötés	(67)
Borjú szérum albumin	AA _n szukcinsav (n=1-4)	amid kötés	(55)
XAK, elágazó láncú polipeptid X = Leu, D-Leu, Pro, Glu, D-Glu, Ser	<i>cis</i> -akonitilsav	amid kötés	(53, 68)
Koleszterol észter analóg	tetrapeptid (ALAL)	amid kötés	(69)
Formaldehid	-	metil-híd 3'-NH ₂ és 4'-OH között	(57)
Aminooxi-tripeptid	levulinsav 5-oxo-hexánsav	oxim kötés	(63)
Ösztrogén	aminooxi ecetsav propargil csoport	amid kötés metil-híd	(58)
Neuropeptid Y	maleimid hidrazid származék maleimid karbonsav származék	hidrazon és tioéter kötés amid és tioéter kötés	(46)
Négyszögsav észter	-	négyszögsav-amid kötés	(59)
Oligonukleotid	1,6-dijód-hexán	éter kötés	(64)
α-metoxi-poli(etilénlglikol)- tiopropionsav amid és α,ω-bisz-tiopropionsav amid poli(etilénlglikol)	maleimid hidrazid származék maleimid karbonsav származék	hidrazon és tioéter kötés amid és tioéter kötés	(48)
Polirotaxán	szukcinsav	éter kötés	(70)
Oligoarginin	szukcinsav	amid kötés	(71)
Oligoarginin	négyszögsav aminooxi-ecetsav α-glutaminsav-hidrazid	négyszögsav-amid oxim kötés hidrazon kötés	(72)

1.1.3. Pemetrexed

Pemetrexed (ALIMTA™, LY231514) egy új folsav antagonistá vegyület, mely még klinikai kipróbálás alatt áll. A lometroxol analógjaként Eli Lilly & Company (Indianapolis, Indiana, Amerikai Egyesült Államok) fejlesztette ki (6. ábra).

6. ábra Pemetrexed kémiai szerkezete



Biológiai viselkedéséről, hatásairól és a hatásmechanizmusról 2000 óta jelennek meg tudósítások. A sejtek belsejében a folát receptorhoz kötődik majd a folil-poliglutamát szintáz enzim közreműködésével poliglutamálódik. A így létrejött poliglutamát (elsősorban pentaglutamát) az eredetnél hatásosabb forma, három, a purin és pirimidin szintézisében részt vevő enzim [timidilát szintáz (TS), dihidrofolát reduktáz (DHFR), glicinamid ribonukleotid formiltranszferáz (GARFT)] működését gátolja (73, 74).

Az új antimetabolit citotoxikus aktivitását előbb különböző tumor sejteken (CCRF-CEM leukémia, GC3/C1 és VRC5 vastagbél karcinoma, BXP3 hasnyálmirigy karcinoma, MX-1 mell karcinoma, LX-1 nem-kis sejtés tüdő rák sejtek) (75) *in vitro*, majd fázis I, II és III kísérletekben, változatos beteg csoportokon *in vivo* vizsgálták. Alkalmazták önállóan (76-79) majd más, ismert tumor ellenes szerekkel [platina vegyületek (80-83), erlotinib (84), gemcitabine (85-87), paclitaxel (88), bevacizumab (89)] és sugárkezeléssel is kombinálták (90). Hatását a hasonló szerkezetű folsav antagonisták (metotrexát, raltitrexed) és forgalomban levő tumor ellenes szerek [cisplatin (91), taxoidok (paclitaxel, docetaxel) (92), gemcitabine] aktivitásával hasonlították össze különböző tumoros betegségeknél (93, 94). Elsősorban a nem-kis sejtés tüdő rák (95, 96) és a rosszindulatú tüdő mesotelioma (97-99) kezelésére alkalmazzák. Mellékhatásai elsősorban a vérképzéssel kapcsolatosak (neutropénia, granulocitopénia, trombocitopénia), melyek folsav valamint B12 vitamin pótlásával csökkenthetők (100).

Mivel a vegyület alig egy évtizedes múltat tekint vissza, konjugátumairól nem tudunk. Hordozóhoz való kapcsolásával azonban hasonlóan más tumor ellenes szerek esetében, itt is megváltozott hatással számolhatunk.

Pemetrexed szerkezete egy hat- és egy ötagú gyűrűt (pirrolo[2,3-d]pirimidin magot) tartalmaz, eltérően más folsav antagonistáktól, ahol két hattagú gyűrű (pterin vagy kinazolin gyűrűrendszer) kapcsolódik egymáshoz (101). A szerkezeti eltérésből új konjugálási stratégia adódik, ami lehetővé teszi, hogy a biológiai aktivitás szempontjából fontos karboxil-csoportok, melyek a poliglutamáció során töltenek be fontos szerepet, sértetlenül maradjanak.

1.2 Peptid hordozók

Peptid alapú hordozó molekulák számos előnyös tulajdonsággal rendelkeznek, ami biológiai rendszerekben való alkalmazásukat lehetővé teszi. Kis méretük következtében jól jellemezhető és reprodukálható, biokompatibilis, vízdíható polimerek, segítségükkel nagyszámú kötőhely kialakítása lehetséges. A hatóanyag és hordozó közti kötés létrehozására az aminosavak változatos oldalláncainak köszönhetően több lehetőség is van. A kötés, ahogy maga a hordozó peptid is a szervezetben lebontható, ezzel lehetőség nyílik a hatásos molekula felszabadulására és a hordozó kiürülésére a szervezetből. Peptid hordozók jelenléte pozitívan módosíthatja az eredeti molekula tulajdonságait. A hatóanyag mellékhatásainak csökkenése, megnövekedett vagy szélesebb spektrumú hatás kialakulása is várható a hordozóval való konjugálás után. A hatásos molekula célba juttatására vagy szelektivitásának növelésére is adódik lehetőség, mivel célba juttató szekvencia is könnyen beépíthető a peptidláncba.

1.2.1. Sejtpenetráló oligoargininek

Az oligoargininek a sejtpenetráló peptidek csoportjába tartoznak. Szintézisükre azután került sor, hogy különböző eredetű, argininben gazdag peptidekről (HIV-Tat, Antennapedia) kiderült, képesek átjutni a sejtmembránra és a hozzájuk kovalensen kapcsolt molekulákat (peptidek, fehérjék, kis szerves molekulák) is be tudják juttatni a sejtekbe (102, 103). Megállapították, hogy az oligoargininek más bázikus aminosavakból álló (lizin, ornitin, hisztidin) oligopeptidekhez képest hatékonyabban jutnak be a sejtek belsejébe (104). Bizonyították, hogy a sejtbe jutás hatékonysága nem függ az arginin kiralitásától, azonban az oldalláncán jelen levő guanidino-csoport fontos szerepet játszik a transzlokációban (105). A hatásos sejtbevételhez az oligopeptidben 6-12 arginin jelenléte szükséges (106). Világszerte több kutatócsoport foglalkozik a sejtpenetráló peptidek felvételi mechanizmusának vizsgálatával (107, 108). Megállapították, hogy a sejtbevétel mechanizmusa és hatékonysága függ a peptidekhez kötött molekula fizikai-kémiai tulajdonságaitól, valamint a vizsgált sejt típusától is. Oligoargininek esetében a transzlokáció mechanizmusa még vita tárgya, mégis többféle vegyület sejtbe juttatására alkalmazták már sikerrel az évek során. Segítségével peptid vagy fehérje alapú

Bevezetés

hatóanyagokat juttattak át sikeresen a sejtmembránon, például: ciklosporin A, inzulin, Smac (second mitochondria-derived activator of caspases) peptid (109, 110). Emellett az irodalomban egyre több példát találunk kis szerves molekulák, hatóanyagok sejtbe juttatására is, például: taxol (111) és adenosin (112) származékok. Az oligoarginin peptidekkel kapcsolt molekulákat és a konjugálás célját a 3. táblázat foglalja össze.

3. táblázat Irodalmi példák oligoarginin konjugátumok szintézisére

Kapcsolt molekula	Hordozó molekula	Konjugálás célja	Hivatkozás
Fluoreszcein	R ₅ -R ₉ r ₅ -r ₉	A peptidek sejtbejutási képességének vizsgálata (Jurkat sejt)	(105)
Biotin Ciklosporin A	R ₇	Bőrön átjutó képesség vizsgálata (egér kísérlet)	(113)
Fluoreszcein	R ₄ , R ₆ , R ₈ , R ₁₀ , R ₁₂ , R ₁₆	A peptidek sejtfelvételi mechanizmusának vizsgálata (RAW264.7 egér makrofág sejt)	(106)
Taxol	R ₈	Taxol vízoldhatóságának és sejtbe jutási képességének növelése	(111)
Floureszcein	R ₉	A peptid sejtfelvételi mechanizmusának vizsgálata (HeLa, CHO-K1 és Jurkat limfoid sejtek)	(114)
Adenosin	R ₄ , R ₆	cAMP-függő protein kináz működésének gátlása (HeLa sejt)	(112)
SmacN7 peptid	R ₆ , R ₈	Apoptózis gátló fehérje gátlása és ezzel apoptózis indukálása (NCI-H460 tumor sejt)	(115)
MRI kontraszt anyag (lantanoida kelát)	R ₈ , R ₁₂ , R ₁₆	A kontraszt anyag sejtbe juttatása (NIH/3T3 egér fibroblaszt sejt)	(116)
Karboxifluoreszcein	R ₉	A peptid sejtfelvételi mechanizmusának vizsgálata (MC57 fibrosarkoma sejt és HeLa sejt)	(117)
poli(2-hidroxitil aszpartamid)-C ₁₈	R ₈	Új makromolekuláris hordozó rendszer kialakítása hatóanyagok sejtbe juttatására (HeLa sejtek)	(118)
¹²⁵ I-p16 kináz inhibitor peptid	R ₉	Sejtbe juttatás és sejtosztódás gátlása (MCF7 sejtek)	(119)

Kapcsolt molekula	Hordozó molekula	Konjugálás célja	Hivatkozás
DNS plasmid	R ₁₅	A DNS-peptid komplex sejtfelvételének vizsgálata (293T sejtek)	(120)
Lipid	R ₈	Új génhordozó rendszer létrehozása, amivel DNS plasmidot juttatnak a sejtbe	(121)
Inzulin	R ₆ , r ₆ , r ₈ , r ₁₀	Insulin gyomorból való felszívódásának serkentése	(122)
Heparin	R _x	Heparin tüdőben való felszívódásának növelése és toxicitásának csökkentése	(123)
MEND	R ₈	MEND sejtfelvételének növelése	(124)
Alexa488 PAD	R ₄ , R ₈ , R ₁₂ , R ₁₆	Oligoargininek sejtfelvételi mechanizmusának vizsgálata (HeLa sejtek)	(125)

A gyógyszer-molekulák fejlesztése oligoargininnel való konjugálás útján új lehetőségeket teremthet a kutatásban. A gyógyászatban régóta alkalmazott, hatékony, de súlyos mellékhatásokkal rendelkező hatóanyagok tovább fejlesztésénél vagy új vegyületek kipróbálásánál felmerülhet a vízdoldhatóság vagy a gyenge sejtpenetráció problémája. Oligoargininnel való konjugálás után a vízben nem vagy rosszul oldódó vegyületek vízdoldhatósága a peptid bázikus tulajdonsága következtében nő, emellett egy olyan új transzlokációs út nyílik meg a konjugátum előtt, amivel biztosított a sejtbe jutás, akár az eredeti hatóanyagra rezisztens sejtekbe is bejuttatható az aktív molekula.

1.2.2. Tüdő specifikus IELLQAR peptid

Az IELLQAR peptidet Fukuda és csoportja azonosította fág peptid könyvtár segítségével (126, 127). Olyan peptidet kerestek, ami az E-szelektin receptorhoz kötődik. A szelektinek a C-típusú lektin gén családba tartoznak, aktivitásuk kalcium-függő. E- és P-szelektin található az aktivált vaszkuláris endotél sejtek felszínén, L-szelektin a limfocitákon. Ligandumaik olyan sejt felszíni szénhidrát molekulák, például szialil Lewis X és A, melyek a sejtek különböző differenciáltsági állapotában jelennek meg szövet- és sejt-specifikusan. Receptor és liganduma így sejt-sejt kölcsönhatásban közvetít. Mivel bizonyos tumor sejtek felszínén szintén megtalálható szialil Lewis X vagy A ligandum

(szialil Lewis X – mell, vastagbél, tüdő karcinóma; szialil Lewis A – colorectal, hasnyálmirigy adenokarcinóma), jelenlétüket kapcsolatba hozták tumor metasztázis képződéssel – ez a szelektin-függő metasztázis (128). Bebizonyosodott, hogy az IELLQAR peptidet hordozó fág vagy a szintetikusán előállított peptid kalcium-függő módon, a sejtfelszíni szénhidrát ligandumokkal versenyezve kötődik az E-, P- és L-szelektin receptorokhoz. A peptid alkalmazásával gátolni tudták néhány, a sejtfelszínen szialil Lewis X ligandumot tartalmazó tumor sejt (például HL-60 humán leukémia, B16-FTIII•M melanoma, HAL-8Luc humán tüdő sejtek) adhézióját *in vitro*, illetve a metasztázisok kialakulását *in vivo*. Később kiderült, hogy a peptid receptora a szelektinek helyett egy eddig ismeretlen receptor, ami endotél sejteken található. A peptid szervezetben való eloszlásának *in vivo* vizsgálatokor megállapították, hogy a tüdő és a kis véredények endotél sejtjeinek felszínén, valamint azok citoplazmájában dúsul (129). Más szervekben (pl. máj, lép, vese, agy) nem találták meg a jelzett peptidet, ezért felmerült, hogy szerv-specifikus, célbajuttató egységként alkalmazzák. Hildebrandt csoportjában funkcionális dextránba csomagolt szuperparamágneses vas-oxid nanorészecskék célbajuttatására próbálták ki egy új, cél-specifikus MRI kontraszt anyag fejlesztésénél (130).

Célkitűzések

Ismert tumor ellenes hatóanyagok vagy új hatóanyag jelöltek fizikai-kémiai és biológiai tulajdonságainak módosítására egy lehetséges megoldás a vegyületek hordozóhoz való kapcsolása. Doktori éveim alatt az ELTE-MTA Peptidkémiai Kutatócsoportban biológiai aktivitással, esetemben tumor ellenes hatással rendelkező vegyületeket (ferrocén származékok, daunomicin és pemetrexed) kapcsoltam hordozó peptidekhez.

Az oligoarginin peptidek a sejtpenetráló peptidek családjába tartoznak. Bár sejtbe jutásuk mechanizmusa máig sem tisztázott teljesen, számos példában bizonyították sejtbe jutó és juttató képességük hatékonyságát. Hordozó peptidként ezért az oligoarginin peptid-családot kívántam vizsgálni. Munkám során különböző tumor ellenes szerek konjugátumainak előállítását terveztem, melyekben az oligoarginin peptidek jelentették a közös pontot.

Több olyan metallocén vegyületet ismertünk, mely biológiai hatással rendelkezik. Az utóbbi időben lendületet vett a ferrocén molekula részletet tartalmazó hatóanyagok biológiai és ezen belül tumor ellenes hatásának vizsgálata. Csoportunk szorosan együttműködött az ELTE Szervetlen Kémiai Tanszékén működő MTA Spektroszkópai Szerkezetkutató Csoporttal, ahol új ferrocén vegyületek előállításával és analitikai jellemzésével foglalkoztak. Az együtt működés során biológiai laborunkban a vegyületek tumor ellenes hatását vizsgálták. E projekt keretében terveztem ferrocén – peptid konjugátumok előállítását. A ferrocén vegyületek közül az egyszerű ferrocén-karbonsav és a tumor ellenes hatással rendelkező ferrocén-akrilsav konjugátumait terveztem elsőként előállítani. Azt kívántam vizsgálni, hogy különböző hosszúságú oligoarginin peptidek jelenléte hogyan befolyásolja az alapmolekulák citosztatikus hatását.

A daunomicin jól ismert, hatékony tumor ellenes hatású vegyület, amit elsősorban különböző leukémiák gyógyítására használnak, káros mellékhatásai azonban behatárolják alkalmazásának lehetőségeit. Hordozó molekulához konjugálva a vegyület hatása változhat, ahogy erre számos példát találunk az irodalomban. Különböző hordozó molekulákhoz változatos technikákkal kapcsolták a daunomicint. Én arra voltam kíváncsi,

hogy ugyanazon peptid hordozók, de különböző kapcsolási stratégia alkalmazása hogyan befolyásolja a hatóanyag tulajdonságait, okoz-e különbséget az eltérő kapcsolási mód vagy hely. Munkám során ugyanazon oligoarginin ($n = 4, 6, 8$) peptidekhez kívántam kapcsolni a daunomicint, a hatóanyag amino- vagy oxo-csoportjának felhasználásával. Ehhez módosított oligoarginin peptidek szintézisét is terveztem. Munkám egy részében a Debreceni Egyetem Gyógyszerési Kémiai Tanszékén működő MTA Antibiotikum-kémiai Kutatócsoport tagjaival dolgoztam együtt.

Pemetrexed az utóbbi években kifejlesztett tumor ellenes hatású vegyület, amit elsősorban a tüdőben előforduló daganatos betegségek gyógyítására próbálnak ki. Hatékonyságát és mellékhatásait ma is vizsgálják. Peptidkonjugátumainak tervezésénél céлом az volt, hogy a vegyület biológiai aktivitásának szempontjából fontos kémiai csoportok, a két karboxil-csoport, sértetlenül maradjon a konjugátumban is. Ezért új kapcsolási stratégia felépítését terveztem, ezután kívántam a peptidkonjugátumok szintézisét elvégezni. Mivel a hatóanyagot a tüdőben előforduló rákos betegségek kezelésére alkalmazhatják, az oligoarginin hordozón kívül egy specifikusan a tüdőbe juttató peptid szekvencia konjugátumba való beépítését is terveztem. E projekt keretében kétszer töltöttem 1-1 hónapot Barcelonában a Pompeu Fabra Egyetemen működő Proteomika és Fehérje Kémiai Csoportban (Proteomics and Protein Chemistry Unit).

Az alapvegyületeket és peptidkonjugátumaikat kémiai és biológiai szempontból is vizsgálni kívántam. Azonosításukra tömegspektrometriás, tisztaságuk igazolására valamint stabilitásuk vizsgálatára analitikai folyadékkromatográfiás módszereket terveztem használni. A biológiai tulajdonságok közül a vegyületek citosztatikus hatását és sejtekbe jutó képességét a csoportunk biológiai laborjában kutató kollégák állapították meg. Az adatok elemzésénél a kémiai tulajdonságok ismeretében közösen vontunk le következtetéseket.

3. Kísérleti rész

3.1. Anyagok

A ferrocén-karbonsavat, ferrocén-akrilsavat és a klórecetsav-anhidridet a Sigma-Aldrich vállalatától (Budapest, Magyarország) szereztük be. A daunomicin hidroklorid a Gyógyszerkutató Intézet ajándéka volt (Budapest, Magyarország). A pemetrexed dinátrium só a Leo Chemical vállalatától (Hong Kong) vettük. Az Fmoc-Rink Amid MBHA gyantát a Novabiochem (Laufelfingen, Svájc) vállalatától szereztük be. Minden aminosav és aminosav származék Bachem (Bubendorf, Svájc) vagy Reanal (Budapest, Magyarország) termék volt. A gyökfogók (tioanizol, etánditiol, fenol), kapcsolószerkezetek (*N,N'*-diizopropil-karbodiimid, *N,N'*-diciklohexil-karbodiimid, 1-hidroxi-benzotriazol, benzotriazol-1-iloxitrisz(dimetilamino) foszfónium hexafluorofoszfát, *N*-diizopropil-etil-amin, *N*-metil-morfolin), hasító reagensek (piperidin, 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undek-7-én, trifluoecetsav), a hidrazin-hidrát, a tionil-klorid, és a trisz-(hidroximetil)-amino-metán-hidroklorid Fluka (Buchs, Svájc) termékek voltak. A szintézisek és tisztítások során használt oldószereket (ecetsav, etil-acetát, dimetil-formamid, diklórmetán, dimetil-szulfoxid, dietil-éter, petroléter, acetone, acetonitril, metanol) a Reanal (Budapest, Magyarország) vállalatától szereztük be. Az ammónium-acetát, nátrium-hidroxid, nátrium-acetát, nátrium-citrát, citromsav szintén Reanal termékek voltak. A 37% sósav oldat a Molar-Chemicals Kft (Budapest, Magyarország), a ninhidrin a Merck Kft (Budapest, Magyarország) terméke volt. A 3,4-dimetoxi-3-ciklobutén-1,2-dion vegyületet, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium bromidot, RPMI-1640 médiumot, borjú magzat szérumot és L-glutamint a Sigma-Aldrich (Budapest, Magyarország) vállalatától szereztük be. A HPMT (D-glükóz, NaHCO₃, NaCl, HEPES, KCl, MgCl₂, Na₂HPO₄ x 2H₂O) keveréket sejtlaborunkban állították elő a Sigma-Aldrich (Budapest, Magyarország) vállalatától beszerzett összetevőkből. A gentamicint a Chinoïn Zrt (Budapest, Magyarország) gyártotta. Az MCI GEL CHP20P gyantát a Supelco (Bellefonte, Pennsylvania, Amerikai Egyesült Államok) vállalatától, a Sephadex géleket (G10 superfine, G25 superfine) a Pharmacia Fine Chemicals AB (Uppsala, Svédország) vállalatától vettük.

3.2. Ferrocén tartalmú peptidkonjugátumok előállítása

3.2.1. Oligoarginin peptidek szintézise

Az oligoarginin peptideket ($\text{H-Arg}_n\text{-NH}_2$; $n = 3, 4, 5, 6, 7, 8$) szilárdfázisú szintézis módszerrel Fmoc/Bu stratégiát alkalmazva, Fmoc-Rink-Amid MBHA gyantán (0,67 vagy 0,72 mmol/mg) állítottam elő. Az aminosavakat N^α -(9-fluorenil)-metiloxikarbonil (Fmoc) származékként kapcsoltam a szilárd hordozóra, az arginin guanidino oldalláncát 2,2,4,6,7-pentametil-benzofurán-5-szulfonil (Pbf) csoport védte. A kapcsolást DIC/HOBt kapcsolószerrel valósítottam meg DMF oldószerben. Az aminosavból és kapcsolószerekből a gyanta kapacitására nézve háromszoros moláris mennyiséget használtam $c = 0,5$ M koncentrációban. Az Fmoc-csoport eltávolítása 2% piperidin és 2% DBU DMF oldatával történt szobahőmérsékleten. A kapcsolat sikerességét ninhidrin próbával (Kaiser-teszt) ellenőriztem (131). A következő szintézis protokollt alkalmaztam: DMF mosás ($3 \times 0,5$ perc); Fmoc-csoport eltávolítása 2% piperidin 2% DBU DMF oldatával (2 perc, 2 perc, 5 perc, 10 perc); DMF mosás (8×1 perc); aminosav kapcsolása (90 perc); DMF mosás ($3 \times 0,5$ perc); DCM mosás ($3 \times 0,5$ perc); ninhidrin próba. A peptidet a szilárdfázisról, valamint a védőcsoportokat az aminosavak oldalláncáról egy lépésben távolítottam el TFA és gyökfogók alkalmazásával (TFA : desztillált víz : EDT : tioanizol : kristályos fenol = 10 mL : 0,5 mL : 0,25 mL : 0,5 mL : 0,75 g). Hasítás után az elegyet hideg dietil-éterbe szűrtem, ahol a peptid kicsapódik. A nyersterméket az éterből többszöri centrifugálással nyertem ki, majd desztillált vízben oldottam és liofilizáltam. Nyerstermékként halványsárga vagy fehér port kaptam.

3.2.2. Ferrocén-karbonsav és ferrocén-akrilsav peptidkonjugátumainak előállítása szilárdfázison

Először oligoarginin peptideket állítottam elő szilárdfázison a 3.2.1. fejezetben leírt módszert alkalmazva ($\text{H-Arg}_n\text{-NH}_2$; $n = 4, 6, 8$). Az utolsó aminosav felkapcsolása után az Fmoc-csoportot 2% piperidin 2% DBU DMF oldatával eltávolítottam, majd ferrocén-karbonsavat (Fc-COOH), illetve ferrocén-akrilsavat (Fc-CH=CH-COOH) kapcsoltam a szilárd hordozóhoz kötött peptid N -terminálisára DIC/HOBt kapcsolószer jelenlétében. A

ferrocén vegyületet és a kapcsolószereket a gyanta kapacitására nézve háromszoros moláris mennyiségben alkalmaztam, $c = 0,5$ M koncentrációban DMF oldószerben. 60 perc reakció után a kapcsolás sikerességét ninhidrin próbával ellenőriztem, pozitív eredmény esetén a kapcsolást megismételtem. Sikeres reakció után a konjugátumot a 3.2.1. fejezetben leírt oligoarginin peptidek szintézisével analóg módon dolgoztam fel TFA hasítással, majd centrifugálással és liofilizálással. Nyersterméként világosbarna port kaptam.

3.2.3. Ferrocén-akrilsav peptidkonjugátumainak előállítását oldatban

Ferrocén-akrilsav peptidkonjugátumainak előállítására a 3.2.2. fejezetben leírt szilárdfázisú szintézis nem hozta a várt eredményt. Az RP-HPLC vizsgálatok nagyon komplex összetételű nyerstermékét mutattak. Ezért a ferrocén-akrilsav peptidkonjugátumait oldatban állítottam elő. Tisztított oligoarginin peptid ($\text{H-Arg}_n\text{-NH}_2$; $n = 6, 8$) szabad *N*-terminálisára kapcsoltam ferrocénakrilsavat BOP/HOBt kapcsolószerezrel DIEA jelenlétében DMF oldószerben. Egy példa: 6 mg (0,023 mmol) ferrocén-akrilsavat, 10,4 mg (0,023 mmol) BOP és 3,5 mg (0,023 mmol) HOBt kapcsolószereket 12 μL (0,070 mmol, $3\times$ mennyiség) DIEA jelenlétében 0,6 mL DMF oldószerben oldottam. Tíz perc előaktiválást követően 50 mg (0,039 mmol, $1,7\times$ mennyiség) oktaarginin peptidet adtam az elegyhez. A reakciót analitikai RP-HPLC segítségével követtem, 5 óra alatt a kívánt végtermék keletkezett. Az oldószert vákuumban eltávolítottam, majd a nyerstermékét desztillált vízben oldottam. A vízben nem oldódó részt kiszűrtem, majd az oldatot liofilizáltam. Nyersterméként világosbarna port kaptam.

3.2.4. Oligoarginin peptidek és ferrocén tartalmú peptidkonjugátumok tisztítása

Az oligoarginin peptideket preparatív FPLC módszerrel tisztítottam preparatív FPLC készüléken (Pharmacia, Uppsala, Svédország), Vydac (C18, 480 \times 25 mm, 25 μm , 300 Å) preparatív oszlopon (Vydac, Hesperia, Kalifornia, Amerikai Egyesült Államok). Lineáris gradiens elúciót alkalmaztam: 0-20% B eluens 0-40 perc alatt. Az A eluens 0,1% TFA tartalmú desztillált víz volt, míg a B eluens 0,1% TFA tartalmú ACN : desztillált víz (80 :

20; v/v%) elegy. A tisztítást 8 mL/perc térfogati áramlási sebességgel végeztem szobahőmérsékleten. A nyers peptidet A eluensben $c = 5 \text{ mg/mL}$ koncentrációban oldottam. Egy injektálásnál maximum 15 mL oldatot vittem fel az oszlopra. A kromatogramot UV detektorral, $\lambda = 220 \text{ nm}$ hullámhosszon vettem fel, a frakciókat összegyűjtöttem. Tisztítás után a frakciókról a szerves oldószert vákuumban eltávolítottam, a vizes oldatot liofilizáltam. Végtermékként fehér port kaptam.

A ferrocén tartalmú konjugátumokat fél-preparatív RP-HPLC módszerrel tisztítottam Knauer (Bad, Homburg, Németország) típusú készüléken, Phenomenex Jupiter (C18, $250 \times 10 \text{ mm}$; $10 \mu\text{m}$, 300 \AA) fél-preparatív oszlopon (Phenomenex, Torrance, CA). Lineáris gradiens elúciót alkalmaztam: 0-40% B eluens 5-45 perc alatt. Az A eluens 0,1% TFA tartalmú desztillált víz volt, míg a B eluens 0,1% TFA tartalmú ACN : desztillált víz (80 : 20; v/v%) elegy. A tisztítást 4 mL/perc térfogati áramlási sebességgel végeztem szobahőmérsékleten. A nyers konjugátumot A eluensben $c = 5 \text{ mg/mL}$ koncentrációban oldottam. Egy injektálásnál maximum 2 mL oldatot vittem fel az oszlopra. A kromatogramot UV detektorral, $\lambda = 220 \text{ nm}$ hullámhosszon vettem fel, a frakciókat összegyűjtöttem. Tisztítás után az összegyűjtött frakciókról a szerves oldószert vákuumban eltávolítottam, a vizes oldatot liofilizáltam. Végtermékként világosbarna port kaptam ($\text{Fc-CO-Arg}_n\text{-NH}_2$, $n = 4, 6, 8$; valamint $\text{Fc-CH=CH-CO-Arg}_m\text{-NH}_2$, $m = 6, 8$).

3.3. Daunomicin peptidkonjugátumok előállítása

3.3.1. Aminooxi-csoportot tartalmazó oligoarginin peptidek szintézise és tisztítása

Oligoarginin peptideket állítottam elő szilárdfázison a 3.2.1. fejezetben leírt módszert alkalmazva ($\text{H-Arg}_n\text{-NH}_2$; $n = 4, 6, 8$). Az utolsó aminosav felkapcsolása után az Fmoc-csoportot 2% piperidin 2% DBU DMF oldatával eltávolítottam, majd Boc-aminooxi-ecetsavat ($\text{Boc-NH-O-CH}_2\text{-COOH}$) kapcsoltam a szilárd hordozóhoz kapcsolt peptid *N*-terminálisára DIC/HOBt kapcsolószer jelenlétében. Az aminosavat és a kapcsolószereket a gyanta kapacitására nézve háromszoros moláris mennyiségben alkalmaztam, $c = 0,5$ M koncentrációban, DMF oldószerben. 60 perc reakció után a kapcsolás sikerességét ninhidrin próbával ellenőriztem. Sikeres reakció után a konjugátumot a 3.2.1. fejezetben ismertetett módon dolgoztam fel TFA hasítással, majd centrifugálással és liofilizálással. Nyertermékként a nyers peptid tisztaságától függően halványsárga vagy fehér port kaptam, amit fél-preparatív RP-HPLC módszerrel tisztítottam. Knauer (Bad, Homburg, Németország) készüléken, Phenomenex Jupiter (250×10 mm, $10 \mu\text{m}$, 300 \AA) fél-preparatív oszlopon (Phenomenex, Torrance, CA) végeztem a tisztítást lineáris gradiens elúciót alkalmazva: 1-25% B eluens 5-29 perc alatt. Az A eluens 0,1% TFA tartalmú desztillált víz volt, míg a B eluens 0,1% TFA tartalmú MeOH : desztillált víz (90 : 10; v/v%) elegy. A tisztítást 4 mL/perc térfogati áramlási sebességgel végeztem szobahőmérsékleten. A nyers peptidet A eluensben $c = 5$ mg/mL koncentrációban oldottam. Egy injektálásnál maximum 2 mL oldatot vittem fel az oszlopra. A kromatogramot UV detektorral, $\lambda = 220$ nm hullámhosszon vettem fel, a frakciókat összegyűjtöttem. Tisztítás után a frakciókról a szerves oldószert vákuumban eltávolítottam, a vizes oldatot liofilizáltam. Végtermékként fehér port kaptam.

3.3.2. Hidrazid-csoportot tartalmazó oligoarginin peptidek szintézise és tisztítása, az Fmoc-Glu-OMe aminosav szintézise.

Oligoarginin peptideket állítottam elő szilárdfázison a 3.2.1. fejezetben leírt módszert alkalmazva ($\text{H-Arg}_n\text{-NH}_2$; $n = 4, 6, 8$). Az utolsó aminosav felkapcsolása után az Fmoc-csoportot 2% piperidin 2% DBU DMF oldatával eltávolítottam, majd Fmoc-glutaminsav-

metilésztert (Fmoc-Glu-OMe) kapcsoltam a szabad γ -karboxil-csoporton keresztül a szilárd hordozóhoz kapcsolt peptid *N*-terminálisára DIC/HOBt kapcsolószer jelenlétében. Az aminosavat és a kapcsolószereket a gyanta kapacitására nézve háromszoros moláris mennyiségben alkalmaztam, $c = 0,5$ M koncentrációban, DMF oldószerben. 60 perc reakció után a kapcsolás sikerességét ninhidrin próbával ellenőriztem. Sikeres reakció után a glutaminsav α -metilészter-csoportját hidrazin-hidrát DMF oldatával ($\text{H}_2\text{N-NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O} : \text{DMF} = 10 : 90; v/v\%$) hidrazid-csoporttá alakítottam, majd a peptidet a 3.2.1. fejezetben ismertetett módon dolgoztam fel TFA hasítással, majd centrifugálással és liofilizálással. Nyertermékként halványsárga vagy fehér port kaptam, amit preparatív FPLC módszerrel tisztítottam a 3.2.4. fejezetben ismertetett módon. A kromatogramot UV detektorral, $\lambda = 220$ nm hullámhosszon vettem fel, a frakciókat összegyűjtöttem. Tisztítás után a frakciókról a szerves oldószert vákuumban eltávolítottam, a vizes oldatot liofilizáltam. Végtermékként fehér port kaptam.

A peptid szintéziséhez szükséges Fmoc-Glu-OMe aminosavat Fmoc-glutaminsav- γ -*terc*-butilészter [Fmoc-Glu(O^tBu)-OH] aminosavból állítottam elő két lépésben. Az Fmoc-Glu(O^tBu)-OH aminosav szabad karboxil-csoportját diazometánnal éterben metileztem ismert eljárás szerint (132). A kapott Fmoc-Glu(O^tBu)-OMe aminosavat etil-acetátból petroléterrel kicsaptam, a kivált anyagot lesűrtem, dietil-éterrel mostam és szárítottam. 87% kitermeléssel kaptam a végterméket (fehér por, o.p.: 75-77 °C; Számolt összetétel $\text{C}_{25}\text{H}_{29}\text{NO}_6$: C, 68.32; H 6.65; N, 3.19. Mért összetétel: C, 67.66; H, 6.40; N, 3.25.). Az Fmoc-Glu(O^tBu)-OMe aminosav γ -*terc*-butilészter csoportját TFA : desztillált víz (95 : 5, v/v%) elegyével kb. 1 óra alatt hasítottam, majd az oldószert vákuumban eltávolítottam. A nyerterméket etil-acetátból petroléterrel kicsaptam, 96% kitermeléssel kaptam a végterméket (fehér por, o.p.: 130-132 °C; Számolt összetétel $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{NO}_6$: C, 65.79; H, 5.52; N, 3.65. Mért összetétel: C, 65.04; H, 5.23; N, 3.68.). Kitermelés az Fmoc-Glu(O^tBu)-OH kiindulási aminosavra nézve 83% volt.

3.3.3. Daunomicinil-arginil-négyszögsav diamid előállítás és tisztítása

Daunomicinil-arginil-négyszögsav diamidot (Dau- \square -Arg-OH) két lépésben, a közti termék izolálása nélkül, „one-pot” reakcióban állítottam elő. Az első lépésben

daunomicinil-négyszögsav-monoészter-monoamidot (Dau- \square -OMe) készítettem ismert módszer alapján daunomicin hidroklorid és négyszögsav-dimetilészter reakciójával metanolban (59). Egy példa: 45 mg (0,08 mmol) daunomicin hidrokloridot oldottam 3 mL metanolban. 20 μ L (0,11 mmol) DIEA hozzáadása után az elegyet 10 percig kevertettem. 13,3 mg (0,09 mmol) négyszögsav-dimetilésztert 2 mL metanolban oldottam és ezt az oldatot a daunomicin oldatához adtam. További 10 μ L (0,06 mmol) DIEA hozzáadásával az oldatot pH 7 értékre állítottam, majd az elegyet szobahőmérsékleten kevertettem. A reakciót analitikai RP-HPLC módszerrel követtem, 5 óra alatt a kívánt termék keletkezett. A köztitermék izolálása nélkül folytattam a reakciót. A második lépésben 30 μ L DIEA hozzáadásával az oldatot pH 9 értékre állítottam, majd 23 mg (0,13 mmol) L-arginin aminosavat adtam az oldathoz 0,5 mL MeOH : desztillált víz (50 : 50; v/v%) elegyben oldva. Az oldatot szobahőmérsékleten kevertettem. 24 órán belül vörös kristályok csapódtak ki a reakcióelegyből. A kristályokat kiszűrtem, desztillált vízzel mostam, majd vákuumban szárítottam. A szűrt reakcióelegyet tovább tisztítottam G10 Sephadex géllal töltött oszlopon, eluensként 0,1 M NH_4OAc oldatot alkalmaztam. A vörös színű termék az oszlopon szabad szemmel látható volt. Az összegyűjtött frakcióról az oldószert eltávolítottam, a végterméket AcOH : desztillált víz (10 : 90; v/v%) elegyében oldottam és liofilizáltam, vörös színű port kaptam. Az összesített kitermelés 70% volt.

3.3.4. Négyszögsav linkert tartalmazó daunomicin konjugátumok előállítás és tisztítása

1. módszer

Dau- \square -Arg-OH fent leírt előállításával analóg módon daunomicin hidroklorid, négyszögsav-dimetilészter és oligoarginin peptid ($\text{H-Arg}_n\text{-NH}_2$; $n = 4, 6, 8$) részvételével kétlépéses „one-pot” reakciót hajtottam végre MeOH : desztillált víz (77 : 23, v/v%) elegyben. Egy példa: 6,5 mg (0,01 mmol) Dau- \square -OMe 3,5 mL metanollal készült oldatát 50 μ L (0,32 mmol) DIEA (pH 9) és 30 mg (0,03 mmol) hexaarginin peptid 1 mL vizes oldatának hozzáadása után szobahőmérsékleten legalább 1 napon keresztül kevertettem. A reakciót analitikai RP-HPLC módszerrel követtem. A kívánt termék keletkezését nem tapasztaltam.

2. módszer

Négyszögsav részletet tartalmazó daunomicin-oligoarginin konjugátumokat állítottam elő Dau-□-Arg-OH és oligoarginin peptid ($\text{H-Arg}_n\text{-NH}_2$; $n = 3, 5, 7$) kiindulási anyagokból DCC/HOBt kapcsolószerrel DMSO oldószerben. Egy példa: 11 mg (0,014 mmol) Dau-□-Arg-OH konjugátumot, 2,6 mg (0,017 mmol) HOBt és 20 mg (0,097 mmol) DCC kapcsolószerrel 200 μL DMSO oldószerben oldottam. 17 mg (0,021 mmol) pentaarginin peptidet 200 μL DMSO oldószerben oldottam, majd 10 μL NMM hozzáadásával az oldat kémhatását pH 6-7 közé állítottam. A két oldatot elegyítettem és szobahőmérsékleten kevertettem. A reakciót analitikai RP-HPLC módszerrel követtem, 3-4 óra alatt a kívánt termék képződött.

3.3.5. Oxim kötést tartalmazó daunomicin konjugátumok előállítás

Oxim kötést tartalmazó daunomicin konjugátumokat állítottam elő daunomicin hidroklorid és aminoszén-csoportot tartalmazó oligoarginin peptid ($\text{NH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CO-Arg}_n\text{-NH}_2$; $n = 4, 6, 8$) reakciójával 0,1 M NaOAc/AcOH puffer (pH 5,2) : DMSO (50 : 50; v/v%) oldószerkeverékben. Egy példa: 15 mg (0,03 mmol) daunomicin hidrokloridot és 40 mg (0,03 mmol) $\text{NH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CO-Arg}_8\text{-NH}_2$ peptidet oldottam 0,8 mL oldószerkeverékben, majd az oldatot szobahőmérsékleten kevertettem. A reakciót analitikai RP-HPLC módszerrel követtem, 24 órán belül a kívánt termék keletkezett.

3.3.6. Hidrazon kötést tartalmazó daunomicin konjugátumok előállítás

Hidrazon kötést tartalmazó daunomicin konjugátumokat állítottam elő daunomicin hidroklorid és hidrazid-csoportot tartalmazó oligoarginin peptid ($\text{H-Glu(Arg}_n\text{-NH}_2\text{)-NH-NH}_2$; $n = 4, 6, 8$) reakciójával 0,1 M NaOAc (pH 6,0) : DMF (50 : 50; v/v%) oldószerkeverékben. Egy példa: 16 mg (0,03 mmol) daunomicin hidrokloridot és 30 mg (0,03 mmol) $\text{H-Glu(Arg}_8\text{-NH}_2\text{)-NH-NH}_2$ peptidet oldottam 0,8 mL oldószerkeverékben, majd az oldatot szobahőmérsékleten kevertettem. A reakciót analitikai RP-HPLC módszerrel követtem, 24 órán belül a kívánt termék keletkezett.

3.3.7. Daunomicin–oligoarginin konjugátumok tisztítása

A különböző kötést (négysszogsav-amid, oxim, hidrazon) tartalmazó daunomicin-oligoarginin konjugátumokat két lépésben tisztítottam. Az első lépésben a reakcióban el nem reagált daunomicint távolítottam el géliszűrőssel. G25 Sephadex géllal töltött oszlopot és eluensként desztillált vízzel készült 0,1 M NH_4OAc oldatot alkalmaztam. A vörös színű daunomicin és konjugátum az oszlopon szabad szemmel látható volt. Az összegyűjtött frakciót a második lépésben MCI gélen tisztítottam a reakcióból maradt peptid és az NH_4OAc egy részének eltávolítására. A következő protokollt alkalmaztam: kb. 2 mL MCI gél szűrővel ellátott 10 mL térfogatú fecskendőbe töltöttem; MCI gél metanollal mostam (3×5 perc); MCI gél desztillált vízzel mostam (3×5 perc); a konjugátum híg oldatát az MCI gélhez kevertem (5-10 perc); eltávolítottam az oldószert; az MCI gél desztillált vízzel mostam; a megkötött konjugátumot MeOH : desztillált víz (80 : 20; v/v%) eleggyel lemostam az MCI gélről. A konjugátum összegyűjtött oldatából a metanolt vákuumban eltávolítottam, a vizes oldatot liofilizáltam. Végtermékként vörös színű port kaptam.

3.3.8. Daunomicin-oligoarginin konjugátumok stabilitásának vizsgálata

A különböző kötést (négysszogsav-amid, oxim, hidrazon) tartalmazó daunomicin-hexaarginin konjugátumok stabilitását három, eltérő pH értékű oldószerben vizsgáltam: desztillált vízben, valamint pH 5, illetve 2 kémhatású 0,1 M nátrium-citrát/citromsav pufferben. A konjugátumok mellett kontroll vegyületként a daunomicin stabilitását is meghatároztam ezekben az oldószerekben. A vegyületek kis mennyiségét kb. 1 mL oldószerben oldottam, majd meghatározott időközönként mintát vettem az oldatból, amit analitikai RP-HPLC módszerrel vizsgáltam. Daunomicin, $\text{Dau}-\square-\text{Arg}_6-\text{NH}_2$ és $\text{Dau}=\text{N}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{Arg}_6-\text{NH}_2$ vegyületek oldataiból 5 perc, 1 és 24 óra, valamint 1 és 2 hét elteltével vettem mintát. $\text{H}-\text{Glu}(\text{Arg}_6-\text{NH}_2)-\text{NH}-\text{N}=\text{Dau}$ vegyület esetén a pH 2 vagy 5 kémhatású pufferben történő vizsgálatkor 2, 35, majd 70 perc elteltével vettem mintát, míg desztillált vízben történő vizsgálat esetén 2 és 70 perc, majd 24 óra elteltével történt a mintavétel.

A konjugátum minták homogenitását szilárd állapotban is tanulmányoztam. Két hónapon keresztül rendszeresen ellenőriztem a vegyületek egységességét. Desztillált vízzel készült friss oldataikat analitikai RP-HPLC módszerrel vizsgáltam.

3.4. Pemetrexed peptidkonjugátumok előállítása

3.4.1. Cisztein tartalmú oligoarginin és IELLQAR peptidek szintézise és tisztítása

Cisztein tartalmú hordozó peptideket szilárd hordozón Fmoc/^tBu stratégiát alkalmazva, Fmoc-Rink-Amid MBHA gyantán (0,72 mmol/mg) állítottam elő. Az R₈GGC, IELLQARGGC és IELLQARGGCGGR₈ peptidek szintéziséhez az aminosavakat *N*^α-(9-fluorenil)-metiloxikarbonil (Fmoc) származékként kapcsoltam a szilárd hordozóra. A következő aminosav származékokat használtam: Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Glu(O^tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH. A kapcsolást DIC/HOBt kapcsolószerekkel valósítottam meg DMF oldószerben. Az aminosavakból és kapcsolószerekből a gyanta kapacitására nézve háromszoros moláris mennyiséget használtam *c* = 0,5 M koncentrációban. Az Fmoc-csoport eltávolítása 2% piperidin és 2% DBU DMF oldatával történt szobahőmérsékleten. A kapcsolat sikerességét ninhidrin próbával ellenőriztem. A szintézis protokoll és a peptidek feldolgozása megegyezett a 3.2.1. fejezetben leírt módszerrel. A TFA hasítást, centrifugálást és liofilizálást követően halványsárga vagy fehér port kaptam nyersteammékként, amit preparatív FPLC vagy fél-preparatív RP-HPLC módszerrel tisztítottam a 3.2.4. fejezetben ismertetett módon. A nyersteammét A eluensben vagy A és B eluens (50 : 50; v/v%) keverékében, *c* = 5 mg/mL koncentrációban oldottam. A kromatogramot UV detektorral, λ = 220 nm hullámhosszon vettem fel, a frakciókat összegyűjtöttem. Tisztítás után az összegyűjtött frakciókról a szerves oldószert vákuumban eltávolítottam, a vizes oldatot liofilizáltam. Végeredmékként fehér port kaptam.

3.4.3. Klóracetilezett pemetrexed-dimetilészter szintézise és tisztítása

Klóracetilezett pemetrexed-dimetilésztert [ClAc-Pem(OMe)₂] pemetrexed dinátrium sójából (Pem × 2Na) kiindulva állítottam elő két lépésben. Pemetrexed-dimetilésztert [Pem(OMe)₂] szintetizáltam Pem × 2Na és SOCl₂ reakciójával metanolban (133). 100 mL metanolt -10 °C hőmérsékletre hűtöttem, majd lassan 11 mL (~150 mmol) SOCl₂ reagenst

csepegtettem bele. Az elegyet 20 percig $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ hőmérsékleten tartottam, ez alatt az idő alatt alakult ki a $\text{CH}_3\text{O-S(O)-OCH}_3$ metilező ágens. Az elegyet 1,0 g (2,1 mmol) Pem \times 2Na hozzáadása után lassan szobahőmérsékletre melegítettem, majd 3 órán keresztül refluxoltam. A reakcióban képződő NaCl mellékterméket a forró metanolból kiszűrtem, majd az oldószeret vákuumban elpárologtattam. A SOCl_2 reagens maradékának eltávolítására a nyersteget ismételtelen metanolban oldottam, majd vákuumban elpárologtattam az oldószeret. Ezt a lépést még kétszer ismételtam. A Pem(OMe)₂ nyersteget etanolból kristályosítottam. A kristályokat szűrtem, dietil-éterrel mostam, majd szárítópisztyolyban szárítottam. 90% kitermeléssel kaptam a végterméket (világoszöld por, $217\text{ }^{\circ}\text{C}$ felett bomlik. Számított összetétel, Pem(OMe)₂ \times HCl, $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_5\text{O}_6\text{Cl}$: C, 53,65; H, 5,28; N, 14,22; Cl, 7,22. Mért összetétel: C, 52,24; H, 5,15; N, 14,45; Cl, 6,43.)

ClAc-Pem(OMe)₂ vegyületet Pem(OMe)₂ és klórecetsav anhidrid reakciójával állítottam elő DMF oldószerben. 290 mg (0,60 mmol) Pem(OMe)₂ kiindulási anyagot 4 mL DMF oldószerben oldottam. 110 μL (0,65 mmol) DIEA és 1500 mg (8,77 mmol) klórecetsav anhidrid hozzáadása után a reakcióelegyet $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ hőmérsékleten, 5 órán keresztül kevertettem. A reakció lefolyását analitikai RP-HPLC módszerrel követtem, az elegy a klórecetsav anhidrid mellett főkomponensként diklóracetilezett terméket tartalmazott. A reakcióelegyhez 4 mL 0,1% TFA tartalmú ACN : desztillált víz (80 : 20; v/v%) elegyet és 2 mL desztillált vizet adtam és további 15 órán keresztül szobahőmérsékleten kevertettem. RP-HPLC módszerrel ellenőriztem az elegy összetételét, ami ekkor már főkomponensként monoklóracetilezett terméket tartalmazott. A ClAc-Pem(OMe)₂ végterméket desztillált víz hozzáadásával kicsaptam és leszűrtem, majd etanolból kristályosítottam, leszűrtem, dietil-éterrel mostam és szárítópisztyolyban szárítottam. 70% kitermeléssel kaptam a végterméket (világosbarna por, $185\text{ }^{\circ}\text{C}$ felett elbomlik. Számított összetétel, ClAc-Pem(OMe)₂, $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{ClN}_5\text{O}_7$: C, 54,19; H, 4,93; N, 13,17; Cl, 6,68. Mért összetétel: C, 53,20; H, 4,71; N, 12,60, Cl, 6,69).

3.4.4. Pemetrexed-dimetilészter peptidkonjugátumainak előállítása és tisztítása

Pem(OMe)₂ peptidkonjugátumait ClAcPem(OMe)₂ és cisztein tartalmú peptidek reakciójával állítottam elő 0,1 M Trisz puffer (pH 8) : DMF (45 : 55; v/v%) oldószerkeletben. Három konjugátumot állítottam elő: R₈GGC-Pem(OMe)₂, IELLQARGGC-Pem(OMe)₂, IELLQARGGC(Pem(OMe)₂)GGR₈. A cisztein tiol-csoportjának és a klóracetil-csoportnak a reakciójában tioéter kötés jön létre. 15 mg (0,03 mmol) ClAc-Pem(OMe)₂ kiindulási anyagot 11 mL DMF oldószerben oldottam, majd lassan kevertetve 9 mL 0,1 M Trisz puffert (pH 8) adtam az oldathoz. A cisztein tartalmú peptid másfélszeres mennyiségét lassan, kis adagokban adtam a reakcióelegyhez, míg a kiindulási pemetrexed származék teljesen átalakult. A reakciót analitikai RP-HPLC módszerrel követtem, 10 órán belül a kívánt termék keletkezett. Az oldószert vákuumban eltávolítottam, a nyers konjugátumot A és B eluens (50 : 50; v/v%) keverékében oldottam és fél-preparatív RP-HPLC módszerrel tisztítottam a 3.2.4. fejezetben ismertetett módon. A kromatogramot UV detektorral, $\lambda = 220$ nm hullámhosszon vettem fel, a frakciókat összegyűjtöttem. Tisztítás után az összegyűjtött frakciókról a szerves oldószert vákuumban eltávolítottam, a vizes oldatot liofilizáltam. Végtermékként fehér port kaptam.

3.4.5. Pemetrexed peptidkonjugátumainak előállítása a metilészterek eltávolításával és tisztításuk

Pem(OMe)₂ peptidkonjugátumairól a metilészter-csoportot 0,1 M NaOH oldattal távolítottam el. 10-15 mg dimetilészter-konjugátumot oldottam 0,4 – 0,45 mL 0,1 M NaOH vizes oldat : aceton (50 : 50; v/v%) oldószerkeletben és az oldatot 5 °C hőmérsékleten tartottam. A reakció 60-90 perc alatt lejártszódott. Ezután a reakcióelegyet 0,2 mL 0,1 M HCl oldattal megsavanyítottam, ezzel leállítottam a reakciót. A nyers konjugátumot A és B eluens (50 : 50; v/v%) keverékében oldottam és fél-preparatív RP-HPLC módszerrel tisztítottam a 3.2.4. fejezetben ismertetett módon. A kromatogramot UV detektorral, $\lambda = 220$ nm hullámhosszon vettem fel, a frakciókat összegyűjtöttem. Tisztítás után az összegyűjtött frakciókról a szerves oldószert vákuumban eltávolítottam, a vizes oldatot liofilizáltam. Végtermékként fehér port kaptam.

3.6. Peptidek és peptidkonjugátumok analitikai jellemzése – módszerek

3.6.1. Analitikai fordított fázisú nagy hatékonyságú folyadék kromatográfia (RP-HPLC)

A dolgozatban szereplő peptidek, aminosav-származékok, ferrocén-tartalmú konjugátumok, daunomicin négyszógsav-diamid és oxim ($\text{Dau}-\square-\text{Arg}_n-\text{NH}_2$, $n = 1, 4, 6, 8$ és $\text{Dau}=\text{N}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{Arg}_m-\text{NH}_2$, $m = 4, 6, 8$) konjugátumok, pemetrexed származékok és pemetrexed konjugátumok homogenitásának jellemzését analitikai RP-HPLC módszerrel végeztem. Knauer (Bad, Homburg, Németország) vagy Waters (Budapest, Magyarország; Saint-Quentin

En Yvelines Cedex, Franciaország) típusú készüléket és fordított fázisú, oktadecil-alkilláncsal módosított oszlopot [Phenomenex Synergi (C18, 250×4,6 mm, 4 μm, 80 Å; Phenomenex, Torrance, Kalifornia, Amerikai Egyesült Államok) vagy Supleco Suplecasil™ LC-18-DB (C18, 250×4,6 mm, 5 μm, 120 Å; Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, Amerikai Egyesült Államok)] oszlopot használtam. Lineáris gradiens elúciót alkalmaztam 2 B% / perc gradiens sebességgel 0-5 B% kezdeti eluens összetétellel. Az A eluens 0,1% TFA tartalmú desztillált víz volt, míg a B eluens 0,1% TFA tartalmú ACN : desztillált víz (80 : 20; v/v%) elegy. Az analízist 1 mL/perc térfogati áramlási sebességgel végeztem szobahőmérsékleten. A mintákat A eluensben vagy A és B eluens (50 : 50; v/v%) keverékében oldottam és 20 μL térfogatot injektáltam. A kromatogramot UV detektorral, $\lambda = 220$ nm hullámhosszon vettem fel.

Hidrazon kötést tartalmazó daunomicin konjugátumok [$\text{H}-\text{Glu}(\text{Arg}_n-\text{NH}_2)-\text{NH}-\text{NH}=\text{Dau}$, $n = 4, 6, 8$] reakcióinak és a kész konjugátumok homogenitásának vizsgálatát analitikai RP-HPLC módszerrel végeztem. Knauer (Bad, Homburg, Németország) típusú készüléket és Hamilton PRP-X100 (250×4,6 mm, 10 μm) anioncserélő oszlopot (Hamilton, Reno, Nevada, Amerikai Egyesült Államok) használtam. Lineáris gradiens elúciót alkalmaztam: 100% A eluens 0-3 percig, 0-100% B eluens 3-13 perc alatt, majd 100% B eluens 13-20 percig. Az A eluens 0,1 M NH_4OAc tartalmú desztillált víz volt, míg a B eluens 0,1 M NH_4OAc tartalmú MeOH : desztillált víz (90 : 10; v/v%) elegy. Az analízist 1,5 mL/perc térfogati áramlási sebességgel végeztem szobahőmérsékleten. A mintákat A eluensben oldottam és 20 μL térfogatot injektáltam. A kromatogramot UV detektorral, $\lambda_1 = 220$ nm vagy $\lambda_2 = 490$ nm hullámhosszon vettem fel.

3.6.2. Tömegspektrometria

A dolgozatban szereplő peptidek, aminosav származékok, ferrocén-tartalmú konjugátumok, pemetrexed származékok és pemetrexed konjugátumok azonosítását tömegspektrometriával kollégáim végezték. Bruker Daltonics Esquire Plus 3000 (Bremen, Németország) típusú, ioncsapdás készüléken, folyamatos mintaadagolás mellett (4 μ L/perc sebességgel), elektrospay ionizációt alkalmazva vették fel a spektrumokat pozitív ionizációs módban, $m/z = 200$ - 1500 között. A mintákat 0,1% AcOH tartalmú ACN : desztillált víz (50 : 50; v/v%) elegyben oldották.

A daunomicin konjugátumok azonosítását Dr. Schlosser Gitta tudományos munkatárs végezte el SELDI-TOF (Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight) rendszerű tömegspektrométeren. A mintákat desztillált víz : ACN (50 : 50; v/v%) elegyben oldotta és a mintákat mátrix vegyület hozzáadása nélkül mátrixaktivitással rendelkező SEND (Surface Enhanced Neat Desorption) típusú ProteinChip alkalmazásával vizsgálta. A mérés során a ProteinChip felületét 5 μ L 0,1% TFA tartalmú oldattal 10 másodpercig mosta, majd eltávolította az oldószert és a felületet levegőn megszáritotta. A mintaoldatból 1 μ L mennyiséget tett a ProteinChip felületre, a mintát megszáritotta, majd a spektrumot pozitív ionizációs módban, $m/z = 300$ - 5000 között felvette.

3.7. Peptidkonjugátumok biológiai jellemzése – módszerek

3.7.1. Tumorelles hatóanyagot tartalmazó származékok citosztatikus hatásának meghatározása *in vitro*

A ferrocén, daunomicin és pemetrexed származékok, valamint ferrocén, daunomicin és pemetrexed konjugátumok citosztatikus hatását különböző tumor sejtvonalakon Dr. Reményi Judit, Dr. Szabó Rita és Orbán Erika doktorandusz hallgató határozta meg *in vitro* kísérletekben. Ferrocén származékok és konjugátumok hatását humán leukémia (HL-60) sejteken vizsgálták. Daunomicin konjugátumok esetében humán leukémia (HL-60) sejteken és humán hepatoma (HepG2) sejteken is meghatározták a citosztatikus hatást. Pemetrexed származékok és konjugátumok esetében a humán leukémia (HL-60) sejtek mellett nem-kis sejtű tüdő karcinóma (NCI-H358) sejteken is végeztek vizsgálatokat. Dolgozatomban csak a HL-60 sejteken végzett vizsgálatok menetét és eredményeit ismertetem.

A citosztatikus hatás meghatározása során a kezelendő sejteket 37 °C hőmérsékleten, 5% CO₂ tartalmú atmoszférában, RPMI-1640 médiumban tárolták. A médiumot 10% FCS, 2 mM L-glutamin és 160 µg/mL gentamicin adalék tette alkalmassá a sejtek fenntartására és növesztésére. A vizsgálat elvégzéséhez egy 96-lyukú lemezre, lyukanként 5000 sejtet osztottak és a lemezt 24 órán keresztül kontrollált körülmények között (37 °C, 5% CO₂ tartalom) tartották. Ezután a sejteket a konjugátumok szérum-mentes RPMI-1640 médiummal (vízoldható konjugátumok) vagy DMSO oldószerrel (vízben nem oldódó származékok és konjugátumok) képzett, 0,00026-1000 µM koncentráció tartományba tartozó oldataival kezelték 3 órán keresztül. A kontroll sejteket hatóanyag- és szérum-mentes RPMI-1640 médiummal kezelték. Az inkubációs idő eltelte után a sejteket szérum-mentes médiummal kétszer mosták, majd szérumot is tartalmazó, teljes médiumban tartották további 72 órán keresztül. Ezután az életben maradt sejtek mennyiségét 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium bromid-tesztel (MTT-teszt) határozták meg: 45 µL, 2 mg/ml koncentrációjú MTT-oldatot töltöttek minden lyukba (MTT végső koncentrációja 367 µg/mL volt). A 3,5 órás inkubáció alatt (37 °C, 5% CO₂ tartalom) az élő sejtek mitokondriális dehidrogenáz enzime átalakította az MTT vegyületet, lila kristályok keletkeztek. Az oldószerrel eltávolítása után a kristályokat DMSO oldószerben oldották, majd meghatározták az oldatok optikai sűrűségét (optical

density, OD) $\lambda = 540$ és 620 nm hullámhosszon ELISA Reader (iEMS Reader, Labsystems, Finnország) készülékben. Az OD_{620} értékekből kivonták az OD_{540} értékeket, majd a citosztázis% értékét a következő egyenlettel számolták ki:

$$\text{Citosztázis\%} = \left[1 - \frac{OD_{\text{kezelt}}}{OD_{\text{kontroll}}} \right] \times 100$$

A citosztázis% értékeket a koncentráció függvényében ábrázolták, a konjugátumokhoz tartozó IC_{50} értékeket (az a kezelés során alkalmazott koncentráció, ahol a kezelt sejtek fele elpusztult) a grafikonról olvasták le. A végső IC_{50} érték több mérés eredményének átlaga.

3.7.2. Tumorelleses hatóanyagot tartalmazó származékok sejtbe jutási képességének meghatározása *in vitro*

A daunomicin és peptidkonjugátumainak sejtbe jutási képességét Orbán Erika doktorandusz hallgató határozta meg humán leukémia (HL-60) és humán hepatoma (HepG2) sejteken *in vitro*. Dolgozatomban csak a HL-60 sejteken végzett vizsgálatok menetét és eredményeit ismertetem.

A sejteket 10% FCS, 2mM L-glutamin és 160 $\mu\text{g/mL}$ gentamicin tartalmú RPMI-1640 mediumban tartotta 37 °C hőmérsékleten, 5% CO_2 tartalmú atmoszférában. A sejtfelvétel vizsgálatához egy 24 lyukú lemezre, lyukanként 100.000 sejtet osztott le és a lemezt 24 órán keresztül 37 °C hőmérsékleten tartotta. Az inkubálási idő letelte után a sejteket 1,5 órán keresztül kezelte a daunomicin vagy peptidkonjugátumainak 0,8-100 μM koncentrációjú, szérum-mentes RPMI-1640 médiummal készült oldataival. A kontroll sejteket hatóanyag- és szérum-mentes RPMI-1640 médiummal kezelte. A kezelési idő elteltével a sejteket HPMI médiummal mosta, majd 10 percig tripszinnel kezelte, majd a tripszin hatását 10% FCS tartalmú HPMI médiummal leállította és a sejteket FACS-csővekbe töltötte. A sejtek fluoreszcenciájának növekedését áramlási citometriával (BD LSR II, BD Bioscience, San Jose, Kalifornia, Amerikai Egyesült Államok) határozta meg. Az adatokat FACSDiVa szoftver segítségével dolgozta fel. A vegyületek sejtbe jutási képességét a mért fluoreszcencia értékekkel jellemezte.

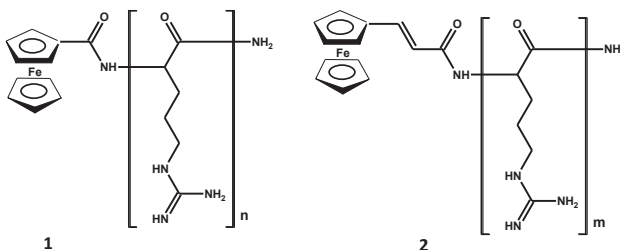
4. Eredmények

4.1. Ferrocén tartalmú peptidkonjugátumok szintézise és *in vitro* citosztatikus hatása

4.1.1. A konjugátumok szintézise

Ferrocén-tartalmú oligoarginin konjugátumokat állítottam elő szilárdfázisú és folyadékfázisú szintézissel (7. ábra).

7. ábra Ferrocént tartalmazó oligoarginin konjugátumok szerkezete



Fc-CO-Arg_n-NH₂ (1, n = 4, 6, 8) és Fc-CH=CH-CO-Arg_m-NH₂ (2, m = 6, 8)

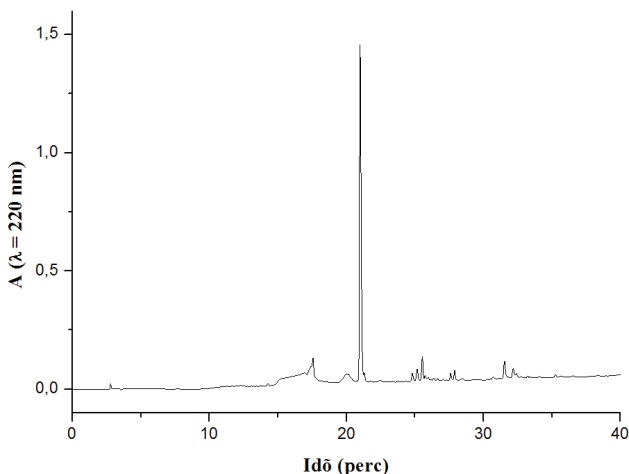
A konjugáláshoz szükséges peptideket szilárdfázison, Fmoc/^tBu stratégiával szintetizáltam Rink Amid MBHA gyantán. *In situ* aktív észteres kapcsolási stratégiát alkalmaztam DIC/HOBt kapcsolószerekkel, az arginin oldallancát Pbf-csoport védte.

Ferrocén-karbonsav peptidkonjugátumait szilárdfázison szintetizáltam. A peptidek N-terminálisára építettem be a ferrocén-karbonsavat az aminosavak kapcsolásával megegyező módon. A reakció sikerességéhez a kapcsolást megismételtam. A konjugátumot gyökfogókat tartalmazó 95% TFA eleggyel hasítottam le a gyantáról. A szintézis sikeres volt, már a nyersterméket is nagy tisztaságban kaptam, ahogy ezt a nyers Fc-CO-Arg₆-NH₂ konjugátum RP-HPLC kromatogramja is mutatja (8. ábra).

A nyersterméket fél-preparatív RP-HPLC módszerrel tisztítottam, majd liofilizálással nyertem a végterméket. A konjugátumok tisztaságát analitikai RP-HPLC módszerrel igazoltam. Az MS vizsgálat bizonyította, hogy a kívánt konjugátumokat kaptam, a

molekula ferrocén-része nem sérült a szintézis és a feldolgozás alatt. A konjugátumokat RP-HPLC retenciós időkkel és MS adatokkal jellemeztem, melyek összefoglalva megtalálhatók a 4. táblázatban.

8. ábra Nyers ferrocén-karbonsav hexaarginin konjugátum RP-HPLC kromatogramja

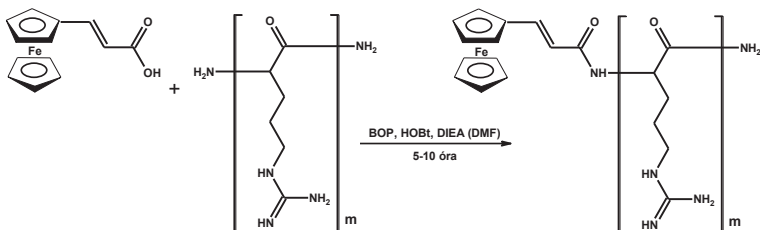


Phenomenex Synergi C18 (250×4,6 mm, 4 µm, 80 Å) oszlop, gradiens elúció 0-90% B eluens 5-50 perc alatt. A eluens 0,1% TFA tartalmú desztillált víz, B eluens 0,1% TFA tartalmú ACN : desztillált víz (80 : 20; v/v%) elegy. Áramlási sebesség 1 mL/perc, szobahőmérséklet, detektálás $\lambda = 220$ nm.

Ferrocén-akrilsav peptidkonjugátumait oldatban állítottam elő, mivel a szilárdfázisú szintézis nagyon komplex összetételű terméket eredményezett. A szilárdfázisú szintézis során a ferrocén vegyület beépülése a ninhidrin reakció alapján sikeresen megtörtént, a hasítást követő analitikai RP-HPLC vizsgálat azonban összetett termékelegyet mutatott. A kromatogram alapján, valamint mivel a ferrocén-rész bizonyítottan stabil marad ilyen típusú szintézis és feldolgozás mellett, polimer termék képződését sejttem. A ferrocén-akrilsavban található kettős kötés a hasítás során alkalmazott erősen savas közegben polimerizálódhat, ez okozhatta, hogy összetett termékelegy alakult ki. A probléma kiküszöbölése érdekében a ferrocén-akrilsav peptidkonjugátumait oldatban állítottam elő DMF oldószerben (9. ábra, m = 6, 8). Ebben az esetben is *in situ* aktív észteres kapcsolást

alkalmaztam, de hatékonyabb kapcsolószerekkel (BOP/HOBT) és kisebb moláris felesleggel dolgoztam. A ferrocén vegyület helyett a peptid moláris mennyisége volt a nagyobb, másfél – kétszeres mennyiség. A ferrocén-akrilsavat a kapcsolószerekkel, háromszoros moláris mennyiségű DIEA jelenlétében, DMF oldószerben előaktiváltam, majd hozzáadtam a peptidet.

9. ábra Ferrocén-akrilsav oligoarginin konjugátumainak előállítása oldatban



A reakciót analitikai RP-HPLC módszerrel követtem. A nyers konjugátumokat fél-preparatív RP-HPLC módszerrel tisztítottam, majd liofilizálással nyertem a végterméket. A tisztítás során 0,1% TFA tartalmú eluenseket használtam. Ilyen koncentrációban a sav jelenléte nem okozott problémát, a konjugátumok stabilnak bizonyultak. A konjugátumok tisztaságát analitikai RP-HPLC módszerrel igazoltam majd MS mérés azonosította az anyagokat. A konjugátumokat RP-HPLC retenciós időikkel és MS adatokkal jellemeztem, melyek összefoglalva megtalálhatók a 4. táblázatban.

4.1.2. A konjugátumok citosztatikus hatása humán leukémia (HL-60) sejteken

A ferrocén-karbonsav, ferrocén-akrilsav, valamint peptidkonjugátumaik *in vitro* citosztatikus hatását Dr. Reményi Judit és Dr. Szabó Rita vizsgálták humán leukémia (HL-60) sejteken. A vegyületek hatását 0,001 – 1000 μM koncentráció tartományban határozták meg MTT-tesztel. Ebben a koncentráció tartományban minden ferrocén származék rendelkezett mérhető antiproliferatív hatással, míg a kontrollként vizsgált oligoarginin peptidek nem mutattak citosztatikus aktivitást. A hatás mértékét IC_{50} értékekkel jellemezték, mely értékeket a szórással együtt a 4. táblázat közli. A ferrocén-karbonsav aktivitásához képest ($\text{IC}_{50} = 694 \pm 2,5 \mu\text{M}$) a vegyület hexa- és oktaarginin konjugátumai alacsonyabb IC_{50} értékeket mutattak ($\text{IC}_{50} = 65 \pm 1,1 \mu\text{M}$, illetve $85 \pm 10,5$

Eredmények

μM), tetraarginin konjugátuma viszont magasabb, a ferrocén-karbonsavhoz hasonló értéket ($\text{IC}_{50} = 353 \pm 104,0 \mu\text{M}$) adott.

4. táblázat Ferrocén származékok, konjugátumok és oktaarginin kémiai és biológiai jellemzői

Vegyület	MS [M] ^a		R_t ^b (perc)	IC_{50} ^c (μM)	S.E.M ^d
	Számolt	Mért			
Fc-CO-Arg ₄ -NH ₂	853,6	853,9	24,5	353	104,0
Fc-CO-Arg ₆ -NH ₂	1165,9	1165,5	21,5	65	1,1
Fc-CO-Arg ₈ -NH ₂	1478,3	1478,5	20,3	85	10,5
Fc-COOH	230,0	230,0	31,3	694	2,5
Fc-CH=CH-CO-Arg ₆ -NH ₂	1191,9	1192,0	19,8	106	21,4
Fc-CH=CH-CO-Arg ₈ -NH ₂	1504,3	1504,2	26,6	39	7,3
Fc-CH=CH-COOH	256,0	256,0	39,8	9,4	3,0
H-Arg ₈ -NH ₂	1266,1	1266,1	12,9	>10.000	n.a.

n.a. = nincs adat

^a ESI-MS

^b RP-HPLC retenciósi idő, Phenomenex Synergi C18 (250×4,6 mm, 4 μm , 80 Å) oszlop, gradiens 0-90% B eluens 5-50 perc alatt; A eluens 0,1% TFA tartalmú desztillált víz, B eluens 0,1% TFA tartalmú ACN : desztillált víz (80 : 20; v/v%) elegy. Áramlási sebesség 1 mL/perc, szobahőmérséklet, detektálás $\lambda = 220 \text{ nm}$.

^c Citosztatikus hatás humán leukémia (HL-60) sejteken

^d Szórás, Standard error of the mean

Ezek szerint a ferrocén-karbonsav antiproliferatív aktivitása körülbelül tízszeresére nőtt a hexa- vagy oktaarginin peptidhez való konjugálás útján, a tetraargininhez való konjugálás azonban nem javította jelentős mértékben a hatást. Ez a különbség magyarázható a hexa- és oktaarginin peptidok sejtpenetráló tulajdonságával, amellyel a tetraarginin peptid még nem rendelkezik. Vélhetőleg a ferrocén vegyület előtt – mely önmagában csak diffúzióval képes a sejtmembránon átjutni – egy új transzlokációs lehetőség nyílik meg az

oligoarginin peptidekhez való konjugálással. Ennek eredményeként a ferrocén származék koncentrációja a sejt belsejében megnőhet, ami magyarázhatja a citosztatikus aktivitás fokozódását. Mindhárom konjugátum vízben való oldhatósága jelentős mértékben nőtt, a vízben nagyon rosszul oldódó kiindulási ferrocén-származékok a konjugálás hatására vízzoldhatókká váltak. Ez a hatóanyag szempontjából hasznos tulajdonság azonban nem volt elegendő ahhoz, hogy a vegyület hatásán jelentősebb mértékben javítson, ahogy ezt a tetraarginin konjugátum eredményeiből látjuk.

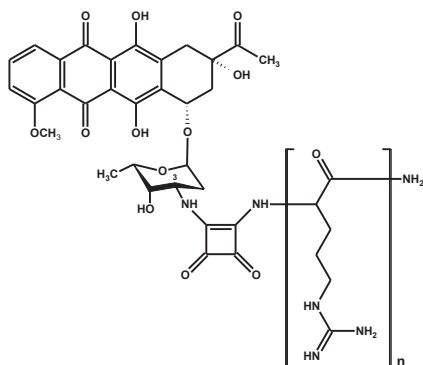
A ferrocén-akrilsav antiproliferatív hatása mind a ferrocén-karbonsavnál, mind annak konjugátumainál jobbnak bizonyult ($IC_{50} = 9,4 \pm 3 \mu M$). Ez az aktivitásnövekedés feltehetően az akril-részlet jelenlétének köszönhető. Hexa- és oktaarginin konjugátumai sem mutattak ennél jobb citosztatikus hatást ($IC_{50} = 106 \pm 21,4$, illetve $39 \pm 7,3$), bár vízben való oldhatóságuk jelentős mértékben nőtt.

4.2. Daunomicin peptidkonjugátumok szintézise és *in vitro* citosztatikus hatása

4.2.1. Négyszögsav linker tartalmazó daunomicin konjugátumok szintézise

Négyszögsav segítségével kapcsolt egy arginint vagy oligoarginin peptidet ($\text{H-Arg}_n\text{-NH}_2$, $n = 4, 6, 8$) tartalmazó daunomicin konjugátumokat állítottam elő különböző szintézis technikát alkalmazva (10. ábra).

10. ábra Négyszögsav linkerrel kapcsolt daunomicin–oligoarginin konjugátumok kémiai szerkezete



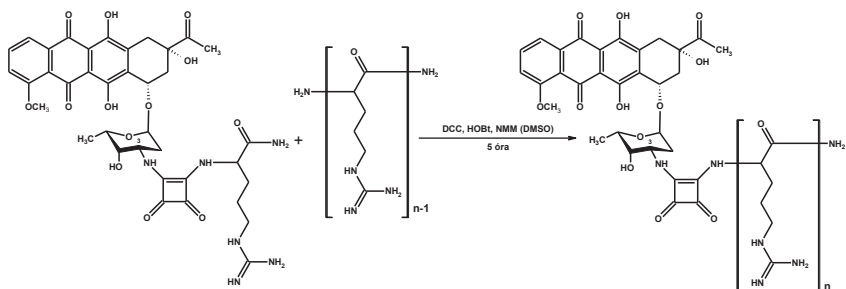
A daunomicin 3-daunozamino-csoportja és az oligoarginin peptid terminális amino-csoportja kapcsolódik. $\text{Dau-}\square\text{-Arg-OH}$, illetve $\text{Dau-}\square\text{-Arg}_n\text{-NH}_2$, $n = 4, 6, 8$

$\text{Dau-}\square\text{-Arg-OH}$ vegyület előállítására egy ismert reakciót dolgoztam át. A négyszögsav-dimetilészter vegyület alkoholos közegben könnyen reagál nukleofil-csoportot (pl. $-\text{SH}$, $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$) tartalmazó vegyületekkel (134, 135). Semleges pH értékű közegben (pH 7) csak az egyik, míg magasabb pH értéken (pH 9) mindkét metilészter-csoportja reakcióba vihető, így alkalmas különböző, nukleofil-csoportot tartalmazó vegyületek konjugálására. A daunomicin glükózamino-csoportját az arginin amino-csoportjával kapcsoltam össze kétlépéses „one-pot” reakcióban. Első lépésben a daunomicin amino-csoportját reagáltattam a négyszögsav egyik metilészter csoportjával pH 7, metanolos közegben az

irodalomban is leírt módon. Mivel a közti termékre (Dau-□-OMe) nem volt szükség, folytattam a reakciót a pH növelésével (pH = 9). A második lépésben az L-arginint vizes-metanolos oldatban adtam a metanolos elegyhez. A megfelelő pH értéket DIEA hozzáadásával szabályoztam az irodalomban javasolt TEA helyett, mivel ez a gyengébb bázis finomabb pH-hangolásra alkalmas. A reakciót analitikai RP-HPLC módszerrel követtem. A végtermék (Dau-□-Arg-OH) egy része kikristályosodott az oldatból, így szűréssel kinyerhetővé vált, a maradék oldatot géliszűréssel tisztítottam. A vegyület homogenitását RP-HPLC módszerrel ellenőriztem és MS mérés igazolta, hogy a kívánt termék keletkezett. A vegyület analitikai adatait a 6. táblázat tartalmazza.

Daunomicin oligoarginin peptidekkel képzett négyszögsav tartalmú konjugátumainak szintézisének a fent leírt reakció nem a várt eredményt hozta. A reakció első lépése megegyezett a Dau-□-Arg-OH szintézisének leírtakkal, a második lépésben azonban az oligoarginin peptidet (H-Arg_n-NH₂, n = 4, 6, 8) vizes oldatban adtam a reakció elegyhez, mivel ezek a peptidek alkoholos közegben nem oldódnak. Ahhoz, hogy a peptid a reakcióelegyben is oldatban maradjon annyi víz hozzáadására volt szükség, ami az első lépésben keletkezett Dau-□-OMe vegyület bomlásához vezetett. Víz hatására a molekula sav formája keletkezik (Dau-□-OH), ami már alkalmatlan a további reakcióra. Mivel ebben a reakcióban a várt termék keletkezését nem tapasztaltam, más módszerrel állítottam elő a konjugátumokat.

11. ábra Négyszögsav tartalmú daunomicin oligoarginin konjugátumok előállítás

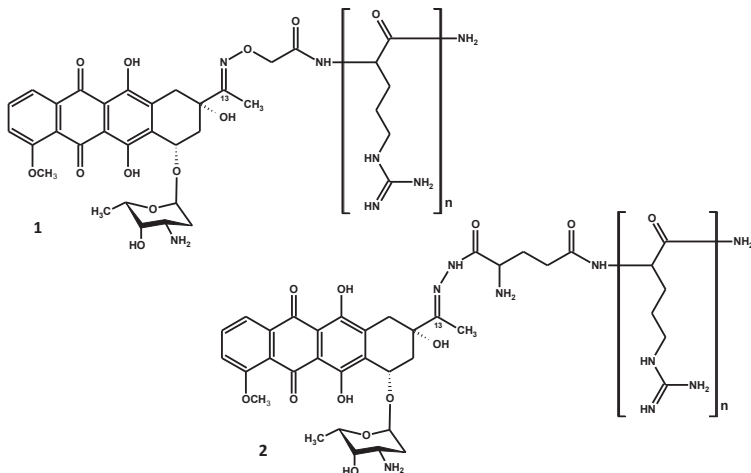


Az előzőleg előállított Dau-□-Arg-OH vegyület karboxil-csoportjához kapcsoltam amid kötéssel a kívánt oligoarginin származéknál eggyel kevesebb arginint tartalmazó peptidet ($\text{H-Arg}_n\text{-NH}_2$, $n = 3, 5, 7$) a terminális amino-csoporton keresztül, DCC/HOBt kapcsolószerekkel DMSO oldószerben (11. ábra). Az oligoarginin peptidek oldhatóságának javítása érdekében a reakcióelegy pH értékét NMM hozzáadásával semlegesre állítottam. A peptidek tisztítása során TFA tartalmú eluenseket használtam, így a peptidek tartalmazhatnak a guanidino-csoporthoz kapcsolódó TFA ellenionokat, amelyek akadályozzák a peptidek oldódását aprotikus oldószerben, ezért semlegesítésük szükséges. A reakciót analitikai RP-HPLC módszerrel követtem. Néhány órán belül a várt végtermék ($\text{Dau-□-Arg}_n\text{-NH}_2$, $n = 4, 6, 8$) keletkezett. A konjugátumok homogenitását a tisztítást követően analitikai RP-HPLC módszerrel ellenőriztem és MS mérés igazolta, hogy a kívánt termék keletkezett. A peptidek analitikai adatait az 5. táblázat, a konjugátumok analitikai adatait a 6. táblázat tartalmazza.

4.2.2. Oxim- vagy hidrazon-kötést tartalmazó daunomicin konjugátumok szintézise

Az oxim- vagy hidrazon-kötést tartalmazó daunomicin konjugátumok (12. ábra) előállításához *N*-terminálison módosított oligoarginin peptideket állítottam elő.

12. ábra Daunomicin oxim és hidrazon konjugátumok szerkezete



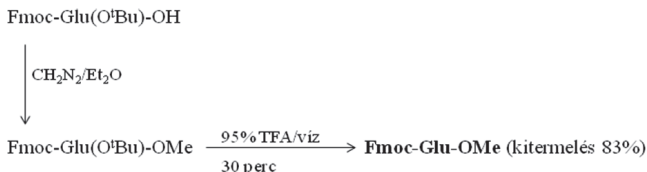
A daunomicin 13-oxo-csoportja és az oligoarginin peptid terminális amino-csoportja kapcsolódik. Dau=N-O-CH₂-CO-NH-Arg_n-NH₂ (1) és H-Glu(Arg_n-NH₂)-NH-N=Dau (2); n = 4, 6, 8

Boc-aminooxi-ecetsavat (Boc-NH-O-CH₂-COOH) illetve Fmoc-glutaminsav-metilésztert (Fmoc-Glu-OMe) kapsoltam szilárdfázison az oligoarginin peptidek *N*-terminálisára az Fmoc-Arg(Pbf)-OH aminosav kapcsolásával analóg módon, de rövidebb kapcsolási időt alkalmazva (60 perc). A Boc-aminooxi-ecetsav kereskedelmi forgalomban kapható, az Fmoc-Glu-OMe aminosavat a hozzáférhető Fmoc-Glu(O^tBu)-OH aminosav származékából állítottam elő két lépésben, jó kitermeléssel (1. séma / a).

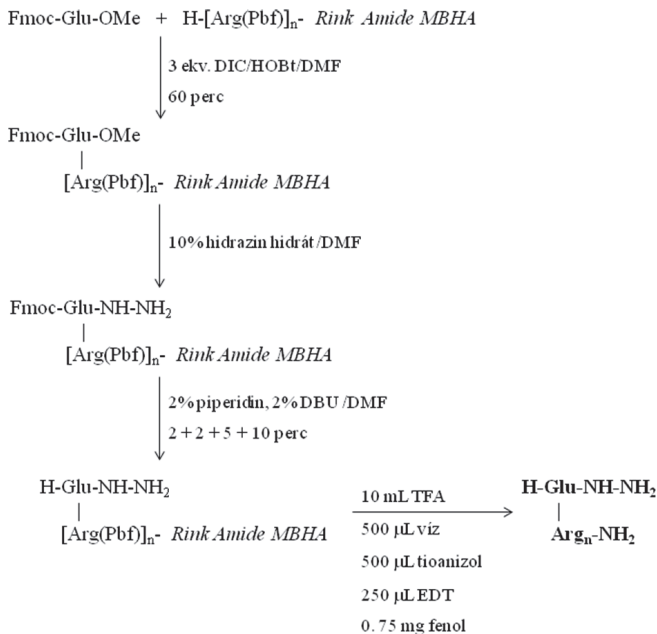
Az Fmoc-Glu-OMe aminosav metil-észter csoportját hidrazin hidrát reagenssel alakítottam át a kívánt hidrazid-csoporttá (1. séma / b).

1. séma Hidrazid csoportot tartalmazó oligoarginin peptidek szintézise

a. Fmoc-Glu-OMe előállítása



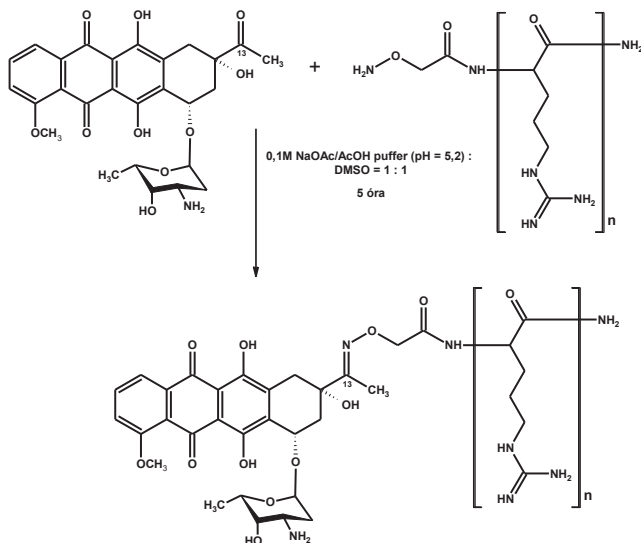
b. Hidrazid-csoport beépítése oligoarginin peptid N-terminálisára (n = 4, 6, 8)



A módosított oligoarginin peptidek feldolgozásának módja megegyezett az egyszerű oligoarginin peptidek feldolgozásával, analitikai adataikat az 5. táblázat tartalmazza. Aminooxi-, illetve hidrazid-csoportot tartalmazó oligoarginin peptideket kaptam, melyek

funkciós csoportjai oxo-csoportot tartalmazó vegyületekkel könnyen reagálnak. A daunomicin 13-oxo-csoportját vittem reakcióba a peptidk amino-oxi- vagy hidrazid-csoportjával (13. ábra). A reakció körülményeit egy, az irodalomból ismert kísérlet-sorozat alapján választottam ki, amelyben peptid-dendrimereket állítottak elő hasonló módszerrel (136). Az oldószer összetételét és pH értékét a reagáló peptid funkciós csoportjához igazítottam. Amino-oxi-csoportot tartalmazó peptid esetén az oldószer pH 5,2 értékű 0,1 M NaOAc/AcOH puffert és DMSO oldószerrel tartalmazott 1 : 1 arányban, míg hidrazid-csoportot tartalmazó peptid esetén, a keletkező hidrazon kötés sav-érzékenysége miatt az oldószer pH 6,0 értékű 0,1 M NaOAc vizes oldatának és DMF oldószernek 1 : 1 arányú elegye volt.

13. ábra Daunomicin oxim-kojugátum előállítás



A reakciót analitikai RP-HPLC módszerrel követtem, minden esetben a várt termék keletkezett (Dau=N-O-CH₂-CO-Arg_n-NH₂, n = 4, 6, 8; illetve H-Glu(Arg_m-NH₂)-NH-N=Dau, m = 4, 6, 8).

A konjugátumok homogenitását, a tisztítást követően analitikai RP-HPLC módszerrel ellenőriztem és MS mérés igazolta, hogy a kívánt termék keletkezett. A konjugátumok analitikai adatait a 6. táblázat tartalmazza.

5. táblázat Daunomicin konjugátumok peptid komponenseinek kémiai jellemzői

Peptidek	MS [M] ^a		R _t ^b (perc)
	Számított	Mért	
H-Arg ₃ -NH ₂	485,6	485,4	4,3
H-Arg ₄ -NH ₂	641,8	641,6	5,6
H-Arg ₅ -NH ₂	798,0	797,7	7,5
H-Arg ₆ -NH ₂	954,2	953,7	14,3
H-Arg ₇ -NH ₂	1110,3	1110,0	17,1
H-Arg ₈ -NH ₂	1266,5	1265,1	18,2
NH ₂ -O-CH ₂ -CO-Arg ₄ -NH ₂	714,8	714,6	12,3
NH ₂ -O-CH ₂ -CO-Arg ₆ -NH ₂	1027,2	1026,8	16,6
NH ₂ -O-CH ₂ -CO-Arg ₈ -NH ₂	1339,6	1339,0	18,2
H-Glu(Arg ₄ -NH ₂)-NH-NH ₂	784,9	784,5	12,0
H-Glu(Arg ₆ -NH ₂)-NH-NH ₂	1097,3	1097,2	15,1
H-Glu(Arg ₈ -NH ₂)-NH-NH ₂	1409,7	1409,5	18,9

^a ESI-MS

^b RP-HPLC retenciók idő, SupelcosilTM LC-18-DB (250×4,6 mm, 5 µm, 120 Å) oszlop, gradiens 5-95% B eluens 5-50 perc alatt; A eluens 0,1% TFA tartalmú desztillált víz, B eluens 0,1% TFA tartalmú ACN : desztillált víz (80 : 20; v/v%) elegy. Áramlási sebesség 1 mL/perc, szobahőmérséklet, detektálás λ = 220 nm.

4.2.3. Daunomicin peptidkonjugátumok tisztítása

Minden daunomicin peptidkonjugátumot gélszűréssel, G25 Sephadex gélen majd ezt követően MCI gélen tisztítottam. A tisztítás során az RP-HPLC módszerrel történő tisztítás során általánosan alkalmazott TFA tartalmú oldószerek elkerülését kívántam elérni (46, 66). A daunomicin glükozidos hidroxil-csoportja savak hatására hasadhat. A tapasztalataim szerint ez a kötés egy TFA tartalmú eluenseket alkalmazó analitikai kromatográfiás eljárás (kb. 1 óra) alatt megfelelő stabilitást mutat, hosszabb ideig történő savas kezelés során azonban sérülhet. Az oligoarginin tartalmú daunomicin konjugátumok RP-HPLC módszerrel történő tisztítás során TFA elleniont köthetnek meg a peptid guanidino-csoportjain. Ez a kötött TFA a liofilizálás után is a konjugátumban marad és hosszabb idő alatt szilárd állapotban is képes a savra érzékeny kötés hasítására, így a már tisztított konjugátum homogenitása jelentősen csökken.

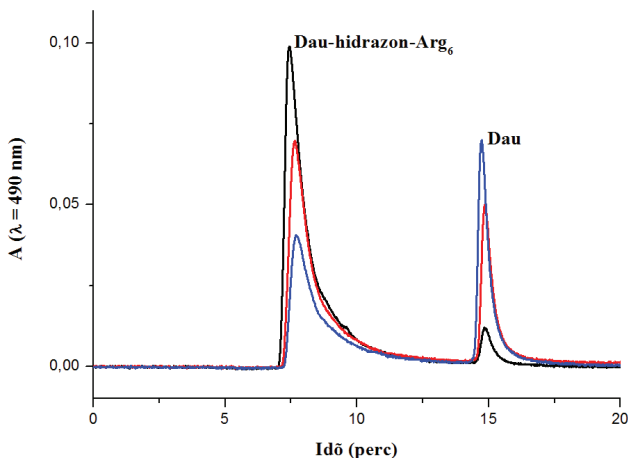
A gélszűrés során desztillált vízben oldott 0,1 M NH_4OAc eluents (pH 7) használtam. Ebben a lépésben az el nem reagált daunomicint és a keletkezett konjugátumot tudtam elválasztani egymástól. Ezt követően MCI gélen tisztítottam tovább a konjugátumokat. Az MCI gélen a vízdoldható és aromás gyűrűt tartalmazó vegyületek kötődnek meg, míg a szennyezők – szabad peptid és az első tisztítási lépésből a konjugátum oldatába került NH_4OAc egy része – lemoshatók. A megkötött konjugátum szerves oldószeres mosással visszanyerhető a gélről.

4.2.4. Daunomicin peptidkonjugátumok stabilitása oldatban és szilárd állapotban

Daunomicin és a különböző kötést tartalmazó daunomicin-hexaarginin konjugátumok stabilitását pH 2 és 5 értékű citrát-pufferben, desztillált vízben és szilárd állapotban vizsgáltam. A négyesszög sav tartalmú és az oxim konjugátum, valamint a szabad daunomicin ilyen körülmények között legalább két hétig megőrizte stabilitását. A hidrazon konjugátumból azonban a daunomicin folyamatos felszabadulását figyeltem meg. Citrát-pufferben pH 2 értéknél a konjugátum mennyiségének a fele kb. 25 perc alatt bomlott el, míg pH 5 értéknél 70 perc alatt (14. ábra). Desztillált vízben a konjugátum stabilabb volt, 48 óra alatt bomlott el mennyiségének a fele. Szilárd formában a

négyszógsav tartalmú és az oxim konjugátum 4 °C hőmérsékleten, míg a hidrazon konjugátum -20 °C hőmérsékleten tartva legalább egy hónapig stabilan eltarthatónak bizonyult.

14. ábra Daunomicin felszabadulása hidrazon kötést tartalmazó daunomicin hexaarginin konjugátumból, 0,1M Na-citrát/citrát (pH 5) pufferben 2 perc (fekete), 35 perc (piros) és 70 perc (kék) elteltével



Hamilton PRP X100 (250×4,6 mm, 10 µm) anion cserélő oszlop, gradiens 0-100% B eluens 3-13 perc alatt, 100% B eluens 13-20 percig; A eluens 100 mM NH₄OAc desztillált vízben, B eluens 100 mM NH₄OAc MeOH : desztillált víz (90 : 10; v/v%) elegyben. Áramlási sebesség 1,5 mL/perc, szobahőmérséklet, detektálás λ = 490 nm.

4.2.5. Daunomicin peptidkonjugátumainak citosztatikus hatása és sejtbe jutási képessége humán leukémia (HL-60) sejteken

A daunomicin és peptidkonjugátumainak *in vitro* citosztatikus hatását humán leukémia (HL-60) és humán hepatoma (HepG2) sejteken Orbán Erika vizsgálta. Dolgozatomban a HL-60 sejteken végzett kísérletek eredményét ismertetem.

6. táblázat Daunomicin konjugátumok kémiai és biológiai jellemzői

Vegyületek	MS ^a [M]		R _t ^b (perc)	IC ₅₀ ^d (μM)	Sejtfelvétel ^c
	Számolt	Mért			
Dau-□-Arg-OH	779,7	780,5	35,6	n.a.	n.a.
Dau-□-Arg ₄ -NH ₂	1247,3	1248,2	33,0	12,48	3393
Dau-□-Arg ₆ -NH ₂	1559,6	1559,5	32,1	5,16	3664
Dau-□-Arg ₈ -NH ₂	1872,0	1872,0	32,0	15,49	2629
Dau=N-O-CH ₂ -CO-Arg ₄ -NH ₂	1224,3	1224,3	27,0	2,07	3179
Dau=N-O-CH ₂ -CO-Arg ₆ -NH ₂	1536,7	1536,3	26,5	3,02	4391
Dau=N-O-CH ₂ -CO-Arg ₈ -NH ₂	1849,1	1848,6	26,1	5,57	2716
H-Glu(Arg ₄ -NH ₂)-NH-N=Dau	1294,4	1295,2	7,8 ^e	2,04	1670
H-Glu(Arg ₆ -NH ₂)-NH-N=Dau	1606,8	1607,6	7,3 ^e	8,41	1868
H-Glu(Arg ₈ -NH ₂)-NH-N=Dau	1919,2	1919,2	6,7 ^e	2,59	3775
Dau	527,5	n.a.	34,9	0,05	48621

n.a. = nincs adat

^a SELDI-MS

^b RP-HPLC retenciósi idő, Supelcosil™ LC-18-DB (250×4,6 mm, 5 μm, 120 Å) oszlop, gradiens 5-95% B eluens 5-50 perc alatt; A eluens 0,1% TFA tartalmú desztillált víz, B eluens 0,1% TFA tartalmú ACN : desztillált víz (80 : 20; v/v%) elegy. Áramlási sebesség 1 mL/perc, szobahőmérséklet, detektálás λ = 220 nm.

^c RP-HPLC retenciósi idő, Hamilton PRP X100 (250×4,6 mm, 10 μm) anion cserélő oszlop, gradiens 0-100% B eluens 3-13 perc alatt, 100% B eluens 13-20 percig; A eluens 100 mM NH₄OAc desztillált vízben, B eluens 100 mM NH₄OAc MeOH : desztillált víz (90 : 10; v/v%) elegyben. Áramlási sebesség 1,5 mL/perc, szobahőmérséklet, detektálás λ = 490 nm.

^d Citosztatikus hatás humán leukémia (HL-60) sejteken

^e Humán leukémia (HL-60) sejtek konjugátum-feltevő képességét jellemző fluoreszcencia intenzitás

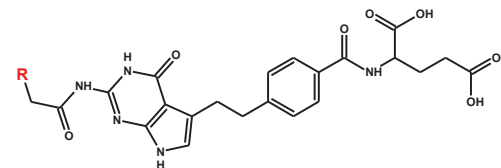
A vegyületek aktivitását $0,00026 - 100 \mu\text{M}$ koncentráció tartományban MTT-teszttel határozta meg és hatásukat IC_{50} értékkel jellemezte. Ezen kívül a vegyületek sejtbe jutási képességét is vizsgálta áramlási citometriával. Az adatok a 6. táblázatban megtalálhatók. A daunomicin citosztatikus hatása ($\text{IC}_{50} = 0,05 \pm 0,05 \mu\text{M}$) és sejtbejutási képessége származékainál jobbnak bizonyult. A konjugátumok citosztatikus hatását a kapcsolt oligoarginin peptid hossza és az alkalmazott kötéstípus is befolyásolta. Az adatok részletes elemzése során kiderült, hogy a négyszögsav linkerrel konjugált származékok citosztatikus aktivitása elmaradt az oxim vagy hidrazon származékok aktivitásától. Az irodalomból ismert, hogy a daunomicin glükózamino-csoportjának fontos szerepe van a vegyület biológiai hatásának kiváltásában. A négyszögsav linker ezen a csoporton kapcsolódik, megakadályozva, hogy a daunomicin maximális hatását kifejtsen, amivel magyarázható ezen konjugátumok az oxim és hidrazon származékokhoz képest is alacsony aktivitása. Az oxo-csoporton kapcsolt származékok esetében a tetraarginin konjugátumok bizonyultak a leghatékonyabbnak (hidrazon $\text{IC}_{50} = 2,04 \pm 0,39 \mu\text{M}$, illetve oxim $\text{IC}_{50} = 2,07 \pm 0,94 \mu\text{M}$), míg az amino-csoporton konjugált vegyületek közül a hexaarginint tartalmazó konjugátum ($\text{IC}_{50} = 5,16 \pm 1,78 \mu\text{M}$) volt a legsikeresebb. A legkisebb IC_{50} értékekkel az oxo-csoporton kapcsolt tetraarginin konjugátumok rendelkeznek, ezek a leghatékonyabb származékok. A sejtbejutás tekintetében azonban a hexaarginint tartalmazó oxim konjugátum volt leginkább kiemelkedő, emellett IC_{50} értéke ($\text{IC}_{50} = 3,02 \pm 0,27 \mu\text{M}$) sem maradt el a tetraarginin származékokétól.

4.3. Pemetrexed peptidkonjugátumok

4.3.1. Pemetrexed származékok szintézise

Pemetrexed peptidkonjugátumok előállítására olyan módszert dolgoztam ki, melynek eredményeképpen a végtermékben a hatóanyag aktivitásáért felelős karboxil-csoportok szabadon maradtak (15. ábra).

15. ábra Pemetrexed peptidkonjugátumok szerkezete

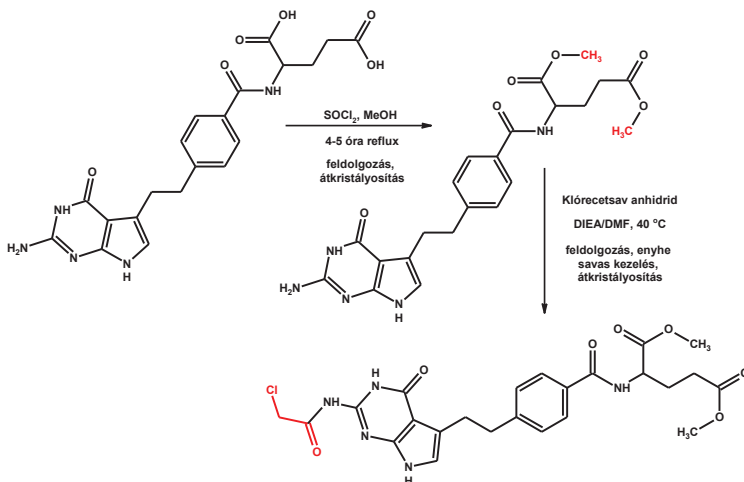


A konjugáláshoz klóracetil-csoportot építettem be a molekula aromás amino-csoportjára, ami a peptidek szekvenciájában jelen lévő cisztein aminosav tiol-csoportjával képes reagálni. A klóracetilezési reakció előtt a karboxil-csoportok átmeneti védelmről gondoskodtam. Ismert reakció alapján, tionil-klorid reagenssel készítettem pemetrexed-dimetilésztert [Pem(OMe)₂] metanolban (16. ábra). Jó kitermeléssel kaptam a végterméket, amit etanolból kristályosítottam, majd szárítottam. A kapott Pem(OMe)₂ vegyület homogenitását analitikai RP-HPLC módszerrel ellenőriztem, összetételét az MS mérés mellett elemanalízis is igazolta. Analitikai adatait a 8. táblázat tartalmazza.

A klóracetilezéshez hatékony reagenst használtam nagy feleslegben, mivel a pemetrexed aromás amino-csoportja kevésbé reakcióképes (16. ábra). Kísérleteim során kiderült, hogy az alkalmazott körülmények között a várt terméken kívül egy melléktermék is keletkezik. MS vizsgálat igazolta, hogy egy két klóracetil-csoportot tartalmazó származék keletkezik. A reakció során egyszerre volt jelen a kiindulási Pem(OMe)₂, az egyszeresen és a kétszeresen klóracetilezett termékkel együtt. A megfelelő kitermelés elérésének esélye ilyen esetben kicsi. Megfigyeltem, hogy a második klóracetil-csoport enyhe savas

körülmények között könnyen lehasítható a molekuláról és a kívánt termék jó kitermeléssel előállítható. Ezért olyan körülményeket dolgoztam ki, melyek alkalmazásával a reakcióban csak a két klóracetil-csoportot tartalmazó molekula jött létre. A Pem(OMe)₂ vegyületet 14-15 ekvivalens mennyiségű klórecetsav-anhidrid reagenssel vittem reakcióba DIEA jelenlétében, DMF oldószerben. A reakció sikerességéhez a hőmérsékletet is megemelttem (40 °C). Ezután enyhe savas körülmények között eltávolítottam a második klóracetil-csoportot, majd a terméket etanolból kristályosítottam, szárítottam. Megfelelő kitermeléssel kaptam a klóracetil-pemetrexed-dimetilésztert [ClAc-Pem(OMe)₂], amit analitikai RP-HPLC, MS és elemanalízis módszerekkel vizsgáltunk. Analitikai adatait a 7. táblázat tartalmazza.

16. ábra Reakcióegyenlet: pemetrexed-dimetilészter és klóracetil származékának előállítása



4.3.2. Pemetrexed-dimetilészter peptidkonjugátumainak szintézise

Pemetrexed peptidkonjugátumok előállításához C-terminálison módosított sejtpenetráló oktaarginin és célbajuttató IELLQAR peptidet, valamint egy, mindkét szekvenciát tartalmazó származékot IELLQARGGCGGR₈ állítottam elő a szilárdfázisú peptid szintézis Fmoc^tBu módszerével. A peptidek feldolgozásának módja megegyezett az oligoarginin peptidek esetében használttal. A C-terminálison vagy a szekvencia közepén

ciszteint tartalmazó peptideket kaptam, melynek tiol-csoportja a pemetrexed molekulába épített klóracetil-csoporttal lúgos közegben reagálni képes. A peptidek trisz-puffer (pH 8) – DMF elegyben reagáltak a ClAc-Pem(OMe)₂ vegyülettel. Ez a peptidkémiai jól ismert reakció a várt eredményt hozta. Tioéter kötést tartalmazó konjugátumok és melléktermékként peptid dimerek keletkeztek. A konjugátumok homogenitását tisztítás után analitikai RP-HPLC módszerrel ellenőriztem és MS vizsgálat igazolta, hogy a várt vegyületek keletkeztek. A konjugátumok analitikai adatait a 7. táblázat tartalmazza.

7. táblázat Pemetrexed konjugátumokhoz készített peptidek és pemetrexed-dimetil származékok kémiai jellemzői

Vegyületek	MS [M] ^a		R _t ^b (perc)
	Számított	Mért	
ClAc-Pem(OMe) ₂	531,2	531,2	32,9
IELLQARGGC-amide	1057,6	1057,4	25,6
R ₈ GGC-amide	1483,7	1483,5	19,1
IELLQARGGCGGR ₈ -amide	2421,8	2124,9	35,2
IELLQARGGC[Pem(OMe) ₂]-amide	1553,7	1553,5	32,3
R ₈ GGC[Pem(OMe) ₂]-amide	1979,2	1979,0	26,7
IELLQARGGC[Pem(OMe) ₂]GGR ₈ -amide	2917,3	2917,2	34,6

^a ESI-MS

^b RP-HPLC retenciók idő, SupelcosilTM LC-18-DB (250×4,6 mm, 5 μm, 120 Å) oszlop, gradiens 5-95% B eluens 5-50 perc alatt; A eluens 0,1% TFA tartalmú desztillált víz, B eluens 0,1% TFA tartalmú ACN : desztillált víz (80 : 20; v/v%) elegy. Áramlási sebesség 1 ml/perc, szobahőmérséklet, detektálás λ = 220 nm.

4.3.3. Pemetrexed peptidkonjugátumok szintézise

A pemetrexed karboxil-csoportjainak átmeneti védelmére szolgáló metilészter-csoportokat a peptidekkel való konjugálás után távolítottam el a molekuláról. Lúgos körülmények között (0,1 M NaOH) hasítottam a metilészter-csoportokat. Lúgos körülmények között a pemetrexed amino-csoportjára épített acetyl-csoport, a hozzá kapcsolt peptiddel együtt, is lehasadhat a molekuláról, ezért az alkalmazott NaOH pontos mennyiségét és a reakcióidőt mindhárom konjugátum esetében előkísérlettel megállapítottam. Két – háromszoros mennyiségű NaOH oldat és ugyanannyi térfogat aceton elegyében oldottam a konjugátumokat. A reakció 5 °C hőmérsékleten 60-90 perc alatt ment végbe a vegyületek sérülése nélkül. Az acetyl-csoport ilyen körülmények között 2-3 óra elteltével szakad le a molekuláról. Mielőtt ez bekövetkezett volna 0,1 M HCl oldattal semlegesítettem a NaOH oldatot és leállítottam a reakciót.

8. táblázat Pemetrexed-dimetilészter és pemetrexed peptidkonjugátumok kémiai és biológiai jellemzői

Pem és származékai	MS ^a [M]		R _t ^b (perc)	IC ₅₀ ^c (μM)
	Számolt	Mért		
Pem(OMe) ₂	455,2	455,3	29,0	11,80
IELLQARGGC[Pem]-amide	1525,7	1525,8	28,7	2,17
R ₈ GGC[Pem]-amide	1951,2	1951,5	24,4	7,90
IELLQARGGC[Pem]GGR ₈ -amide	2889,3	2890,3	33,3	2,64
Pem	427,1	427,3	32,2	0,55

^a ESI-MS

^b RP-HPLC retenciók idő, SupelcosilTM LC-18-DB (250 × 4,6 mm, 5 μm, 120 Å) oszlop, gradiens 5-95% B eluens 5-50 perc alatt; A eluens 0,1% TFA tartalmú desztillált víz, B eluens 0,1% TFA tartalmú ACN : desztillált víz (80 : 20; v/v%). Áramlási sebesség 1 ml/perc, szobahőmérséklet, detektálás λ = 220 nm.

^c Citosztatikus hatás humán leukémia (HL-60) sejteken

A konjugátumok homogenitását tisztítás után analitikai RP-HPLC módszerrel ellenőriztem és MS mérés igazolta, hogy a várt vegyületek keletkeztek. A konjugátumok analitikai adatait a 8. táblázat tartalmazza.

4.3.4. Pemetrexed peptidkonjugátumok citosztatikus hatása humán leukémia (HL-60) sejteken

Pemetrexed, peptidkonjugátumai és Pem(OMe)₂ vegyület *in vitro* citosztatikus hatását humán leukémia (HL-60) és nem-kis sejtis tüdő karcinóma (NCI-H358) sejteken Orbán Erika vizsgálta. Dolgozatomban a HL-60 sejteken végzett kísérletek előzetes eredményét ismertetem, mivel a biológiai vizsgálatok dolgozatom írásának időpontjáig nem zárultak le. A vegyületek aktivitását MTT-teszttel határozta meg és hatásukat IC₅₀ értékkel jellemezte, az adatok szórása a kísérletek kezdeti stádiuma miatt hiányzik. Az adatok a 8. táblázatban találhatók. A pemetrexed citosztatikus hatása (IC₅₀ = 0,55 µM) származékainál jobbnak bizonyult. Az eredményekből kitűnik, hogy a szabad karboxil-csoportok valóban fontosak a vegyület aktivitásának megőrzéséhez. A dimetil-észter származék aktivitása jóval magasabb (IC₅₀ = 11,80 µM), mint az eredeti hatóanyagé. A szabad karboxil-csoportot tartalmazó peptidkonjugátumok citosztatikus hatása a pemetrexedhez képest kis mértékben csökkent, az IELLQAR szekvenciát is tartalmazó konjugátumok hatásosabbak (IC₅₀ = 2,17 illetve 2,64 µM). Az oktaarginin peptid ilyen koncentráció tartományban HL-60 sejteken nem rendelkezik tumor ellenes hatással. Az IELLQAR peptid aktivitásának vizsgálata még folyamatban van. A szabad karboxil-csoportok jelenlétének köszönhetően a pemetrexed megőrizte aktivitását.

5. Összefoglalás

5.1. Ferrocént tartalmazó peptidkonjugátumok

Az irodalomból sokféle, ferrocén részt is tartalmazó vegyület biológiai, ezen belül is tumor ellenes hatása ismert. A változatos hatásmechanizmussal rendelkező alapvegyületek alkalmazása során gyakran előkerül a gyenge vízdoldhatóság vagy a nem megfelelő mértékű sejtfelvétel problémája.

Munkám során a vízdoldhatóságot elősegítő és sejtpenetráló képességgel rendelkező oligoarginin peptidekhez (tetra-, hexa- és oktaarginin) kapsoltam a ferrocén-karbonsav és ferrocén-akrilsav vegyületeket. Szilárdfázisú és folyadékfázisú szintézis technikákat egyaránt alkalmaztam. A konjugálás eredményeként az addig vízben nem oldódó ferrocén vegyületek vízdoldhatókká váltak. A konjugátumok humán leukémia (HL-60) sejteken mért citosztatikus aktivitásának vizsgálata során kiderült, hogy az oligoargininnel való konjugálás nem csak a vízdoldhatóságot, hanem egy vegyület biológiai hatásosságát is növelheti. Nem minden esetben figyelhető meg azonban ez az additív tulajdonság. Ferrocén-karbonsav esetében a hexa- és oktaarginint tartalmazó konjugátum citosztatikus hatása az eredeti vegyület aktivitásánál jobbnak bizonyult, ferrocén-akrilsav esetében azonban ezt nem tapasztaltuk.

5.2. Daunomicin peptidkonjugátumok

A daunomicin az antraciklin típusú tumor ellenes szerek alapvegyülete. Évtizedek óta ismert és alkalmazott hatóanyag, súlyos mellékhatásai azonban korlátozzák hatékonyságát. Analógjairól és konjugátumairól széleskörű ismeretekkel rendelkezünk. Munkám során ugyanazon hordozó peptidekhez (tetra-, hexa- és oktaarginin) kapcsoltam a daunomicin két konjugálásra alkalmas molekula-részét, a glükózamino- és az oxo-csoportot. Három különböző kémiai eljárást alkalmazva jutottam négyszógsavamid, oxim és hidrazon kötést tartalmazó konjugátumokhoz. Ehhez módosított oligoarginin peptideket állítottam elő, valamint kidolgoztam egy új technikát, ami alkalmas daunomicin és az oligoargininektől különböző oligopeptidok négyszógsav diamidjainak előállítására is.

A konjugátumok feldolgozására olyan tisztítási módszert dolgoztam ki, amelyet alkalmazhattam a savra érzékeny vegyületek reakcióelegyből történő kinyerésére. A konjugátumot gélszűrővel a daunomicintől, majd ezt követően egy az aromás gyűrűt tartalmazó vegyületek kiszűrésére alkalmas gélen a peptidtől választottam el. A konjugátumok stabilitása szilárdfázisban az új tisztítási módszernek köszönhetően nőtt, négyszógsavamid és oxim konjugátumok $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$, hidrazon konjugátumok $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hőmérsékleten eltarthatóak. Kiderült, hogy különböző pH értékű pufferekben (pH 2 és 5) és desztillált vízben oldva a négyszógsavamid és oxim konjugátumok legalább két hétig stabilak, míg a hidrazon konjugátumokból néhány óra alatt felszabadul a daunomicin.

A konjugátumok citosztatikus hatással rendelkeztek humán leukémia (HL-60) sejteken, azonban a konjugálás minden esetben csökkentette a daunomicin aktivitását. A sejtbefutás mértékének vizsgálata is ugyanerre az eredményre vezetett, a daunomicin ugyanannyi idő alatt nagyobb mértékben került a sejtekbe. Különbségeket figyeltünk meg viszont a konjugátumok között az alkalmazott konjugálási hely, a létrejött kötés és a kapcsolt peptid hossza alapján. A daunomicin oxo-csoportján konjugált származékok hatásosabbnak bizonyultak a glükózamino-csoporton kapcsolt vegyületeknél. Az oxim és hidrazon vegyületek között a tetraarginin származékok voltak a leghatékonyabbak, IC_{50} értékeik között minimális a különbség – ezenkívül jó eredménnyel rendelkezett a hexaarginint tartalmazó oxim konjugátum is.

5.3. Pemetrexed peptidkonjugátumok

A pemetrexed újonnan kifejlesztett folsav antagonistá vegyület, az antimetabolitok közé tartozó tumor ellenes szer. Hatásának klinikai vizsgálatai napjainkban is folynak. Jelenleg rosszindulatú mellhártya mesotelioma és nem-kis sejtű tüdő karcinóma kezelésére alkalmazzák sikerrel. Munkám során sejtpenetráló oktaarginin peptidhez, egy a tüdőbe juttató peptidhez (IELLQAR) és a mindkét szekvenciát tartalmazó peptid kombinációhoz kapcsoltam a pemetrexedet. Olyan szintézis technikát dolgoztam ki, amely végtermékeként a pemetrexed biológiai aktivitásához szükséges karboxil-csoportjai szabadon maradtak. A pemetrexed heteroaromás amino-csoportját klóracetyl-csoporttal módosítottam, a peptid szekvenciákba pedig cisztein aminosavat építettem be. A két molekula rész összekapcsolásával tioéter kötést alakítottam ki. A reakció végén a karboxil-csoportok átmeneti védelmére szolgáló metilészter-csoportok eltávolításával kaptam a kívánt konjugátumokat.

Az új származékok citosztatikus hatásának humán leukémia (HL-60) sejteken történő vizsgálata során kiderült, hogy a szabad karboxil-csoportok valóban fontosak a vegyület aktivitásának megőrzéséhez. A dimetil-észter származék aktivitása jóval magasabb, mint az eredeti hatóanyagé. A szabad karboxil-csoportot tartalmazó peptidkonjugátumok citosztatikus hatása a pemetrexedhez képest kis mértékben csökkent, az IELLQAR szekvenciát is tartalmazó konjugátumok hatásosabbnak bizonyultak. A szabad karboxil-csoportok jelenlétének köszönhetően a pemetrexed a konjugátumokban is megőrizte aktivitását. Az eredmények megerősítésére és az IELLQAR peptid hatásának további elemzésére vonatkozó vizsgálatok folyamatban vannak.

6. Irodalomjegyzék

1. Rosenberg, B., VanCamp, L., Trosko, J. E., and Mansour, V. H. (1969) Platinum Compounds: a New Class of Potent Antitumour Agents, *Nature*, 385-386.
2. Taylor, A. J., and Wenzel, M. (1978) The Fate of [103Ru]Ruthenocene in Mice and Rats, *Xenobiotica* 8, 107-112.
3. Tiggermann, R., and Govidan, M. V. (1981) A low molecular weight tracer molecule for immunocytochemistry. Identification of cytoplasmic actin, *Experientia* 37, 1066-1068.
4. Hanzlik, R. P., Soine, P., and Soine, W. H. (1979) Biological properties of transition-metal organometallic compounds. 3. beta-Ferrocenylalanine, *Journal of Medicinal Chemistry* 22, 424-428.
5. Giese, R. W. (1983) Metallocenes for protein modification: II. Maleylirontetracarbonyl-maleyl-ribonuclease, *Journal of Inorganic Biochemistry* 18, 301-311.
6. Dombrowski, K. E., Baldwin, W., and Sheats, J. E. (1986) Metallocenes in biochemistry, microbiology and medicine, *Journal of Organometallic Chemistry* 302, 281-306.
7. Gershbein, L. L. (1980) Rat liver regeneration in the presence of nonbenzenoid aromatic agents: ferrocenes and cycloheptatrienes, *Research Communications in Chemical Pathology & Pharmacology* 27, 139-145.
8. Kopf-Maier, P., Leiter, M., and Kopf, H. (1980) Tumor inhibition by metallocenes: Antitumor activity of niobocene and tungstocene dichlorides, *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry* 42, 1789-1791.
9. Edwards, E. I., Epton, R., and Marr, G. (1976) A new class of semi-synthetic antibiotics: ferrocenyl-penicillins and -cephalosporins, *Journal of Organometallic Chemistry* 107, 351-357.
10. Gopal, Y. N. V., Jayaraju, D., and Kondapi, A. K. (2000) Topoisomerase II poisoning and antineoplastic action by DNA-nonbinding diacetyl and dicarboxaldoxime derivatives of ferrocene, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 376, 229-235.
11. Köpf-Maier, P., Köpf, H., and Neuse, E. W. (1984) Ferricenium complexes: A new type of water-soluble antitumor agent, *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 108, 336-340.
12. Osella, D., Ferrali, M., Zanella, P., Laschi, F., Fontani, M., Nervi, C., and Caviglioglio, G. (2000) On the mechanism of the antitumor activity of ferrocenium derivatives, *Inorganica Chimica Acta* 306, 42-48.
13. Jaouen, G., Top, S., Vessieres, A., Leclercq, G., Quivy, J., Lu, J., and Croisy, A. (2000) The first organometallic antioestrogens and their antiproliferative effects, *Organic and organometallic synthesis* 3, 89-93.
14. Swarts, J. C., Swarts, D. M., Maree, D. M., Neuse, E. W., La Madeleine, C., and Van Lier, J. E. (2001) Polyaspartamides as water-soluble drug carriers. Part 1: Antineoplastic activity of ferrocene-containing polyaspartamid conjugates, *Anticancer research* 21, 2033-2037.
15. Neuse, E. W. (2005) Macromolecular ferrocene compounds as cancer drug models, *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials* 15, 3-31.

16. Staveren, D. R., and Metzler-Nolte, N. (2004) Bioorganometallic chemistry of ferrocene, *Chemical Review* 104, 5931-5985.
17. Severin, K., Bergs, R., and Beck, W. (1998) Bioorganometallic chemistry - transition metal complexes with alpha-amino acids and peptides, *Angewandte Chemie International Edition* 37, 1634-1654.
18. Moriuchi, T., Nomoto, A., Yoshida, K., and Hirao, T. (1999) Characterization of ferrocene derivatives bearing podand dipeptide chains (–Ala–Pro-OR), *Journal of Organometallic Chemistry* 589, 50-58.
19. Pietraszkiewicz, M., Wieckowska, A., Bilewicz, R., Misicka, A., Piela, L., and Bajdor, K. (2001) Ferrocene-modified oligopeptide as model compound for charge-transfer interactions with organic electron acceptors, *Materials Science and Engineering: C* 18, 121-124.
20. Wieckowska, A., Bilewicz, R., Misicka, A., Pietraszkiewicz, M., Bajdor, K., and Piela, L. (2001) A novel polynuclear donor complex based on helical peptides with aligned electroactive moieties, *Chemical Physics Letters* 350, 447-452.
21. Kraatz, H.-B., Luszyk, J., and Enright, G. D. (1997) Ferrocenoyl amino acids: A synthetic and structural study, *Inorganic Chemistry* 36, 2400-2405.
22. Kraatz, H.-B., and Galka, M. M. (2001) Ferrocenoyl amino acids and peptides: probing peptide structure, *Metal ions in biological systems* 38, 385-409.
23. Saweczko, P., Enright, G. D., and Kraatz, H.-B. (2001) Interaction of ferrocenoyl-dipeptides with 3-aminopyrazole derivatives: β -sheet models? A synthetic, spectroscopic, structural, and electrochemical study, *Inorganic Chemistry* 40, 4409-4419.
24. Meirim, M. G., Neuse, E. W., and Caldwell, G. A. (1997) Poly(ethylene oxide)-modified polyaspartamide-ferrocene conjugates, *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers* 7, 71-91.
25. Hess, A., Sehnert, J., Weyhermüller, T., and Metzler-Nolte, N. (2000) Chiral ferrocene amines derived from amino acids and peptides: Synthesis, solution and X-ray crystal structures and electrochemical investigations, *Inorganic Chemistry* 39, 5437-5443.
26. Di Gleria, K., Hill, H. A. O., and Wong, L. L. (1996) N-(2-Ferrocene-ethyl)maleimide : a new electroactive sulphhydryl-specific reagent for cysteine-containing peptides and proteins, *FEBS Letters* 390, 142-144.
27. Cuingnet, E., Sergheraert, C., and Tartar, A. (1980) β -ferrocenylalanyl peptides : I. Synthesis of [Fer4, Leu5] enkephalin, *Journal of Organometallic Chemistry* 195, 325-329.
28. Maes, P., Ricoart, A., Escher, E., Tartar, A., and Sergheraert, C. (1988) Synthesis and biological activity of new metallocenic angiotensin II analogs, *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* 53, 2914-2919.
29. Hublau, P., Sergheraert, C., Ballester, L., and Dautrevaux, M. (1983) *European Journal of Medicinal Chemistry* 18, 131-133.
30. Dey, S. K., and Kraatz, H.-B. (2006) Ferrocene-Assisted Stabilization of Collagen Mimetic Helices: Solid-Phase Synthesis and Structure, *Bioconjugate Chemistry* 17, 84-89.
31. Caldwell, G., Meirim, M. G., Neuse, E. W., Beloussow, K., and Shen, W.-C. (2000) Antiproliferative activity of polyaspartamide-ferrocene conjugates containing the biofissionable carboxamide function in the anchoring links, *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers* 10, 93-101.
32. Barisic, L., Dropucic, M., Ropic, V., Pritzkow, H., Srecko, I. K., and Metzler-Nolte, N. (2004) The first oligopeptide derivative of 1-aminoferrocene-1-

-
- carboxylic acid shows helical chirality with antiparallel strands, *Chemical Communications* 17, 2004-2005.
33. Miklán, Z., Szabó, R., Zsoldos-Mády, V., Reményi, J., Bánóczy, Z., and Hudecz, F. (2007) New ferrocene containing peptide conjugates: Synthesis and effect on human leukemia (HL-60) cells, *Biopolymers* 88, 108-114.
 34. Takimoto, C. H., and Calvo, E. (2008) Principles of Oncologic Pharmacotherapy, In *Cancer management: A multidisciplinary approach. Medical, surgical & radiation oncology* (Pazdur, R., Wagman, L. D., Camphausen, K. A., and Hoskins, W. J., Eds.), CMP Medica.
 35. Takimoto, C. H., and Calvo, E. (2007) Principles of Oncologic Pharmacotherapy, In *Cancer management* (Pazdur, R., Wagman, L. D., Camphausen, K. A., and Hoskins, W. J., Eds.), CMP Medica.
 36. Weiss, R. B. (1992) The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin?, *Seminars in Oncology* 19, 670-686.
 37. Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G., and Gianni, L. (2004) Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity, *Pharmacological Reviews* 56, 185-229.
 38. Peng, X., Chen, B., Lim, C. C., and Sawyer, D. B. (2005) The cardiotoxicology of anthracycline chemotherapeutics: translating molecular mechanism into preventative medicine, *Molecular Interventions* 5, 163-171.
 39. Gaal, D., and Hudecz, F. (1998) Low toxicity and high antitumour activity of daunomycin by conjugation to an immunopotential amphoteric branched polypeptide, *European Journal of Cancer* 34, 155-161.
 40. Baurain, R., Masquelier, M., Deprezde, C. D., and Trouet, A. (1983) Targeting of daunorubicin by covalent and reversible linkage to carrier proteins - lysosomal hydrolysis and anti-tumoral activity of conjugates prepared with peptidic spacer arms, *Drugs under Experimental and Clinical Research* 9, 303-311.
 41. Nogusa, H., Yano, T., Kashima, N., Yamamoto, K., Okuno, S., and Hamana, H. (2000) Structure-activity relationships of carboxymethylpullulan-peptide-doxorubicin conjugates - Systematic modification of peptide spacers, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 10, 227-230.
 42. Shiah, J. G., Sun, Y. G., Peterson, C. M., Straight, R. C., and Kopecek, J. (2000) Antitumor activity of N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymer-mesochlorin e(6) and adriamycin conjugates in combination treatments, *Clinical Cancer Research* 6, 1008-1015.
 43. Kamada, H., Tsutsumi, Y., Yoshioka, Y., Yamamoto, Y., Kodaira, H., Tsunoda, S., Okamoto, T., Mukai, Y., Shibata, H., Nakagawa, S., and Mayumi, T. (2004) Design of a pH-sensitive polymeric carrier for drug release and its application in cancer therapy, *Clinical Cancer Research* 10, 2545-2550.
 44. Hurwitz, E. (1983) Specific and nonspecific macromolecule drug conjugates for the improvement of cancer-chemotherapy, *Biopolymers* 22, 557-567.
 45. Zunino, F., Dimarco, A., and Velcich, A. (1977) Steric influence of orientation of primary amino group at position-3 of sugar moiety of anthracycline antibiotics in DNA binding properties, *Cancer Letters* 3, 271-275.
 46. Langer, M., Kratz, F., Rothen-Rutishauser, B., Wunderli-Allenspach, H., and Beck-Sickinger, A. G. (2001) Novel peptide conjugates for tumor-specific chemotherapy, *Journal of Medicinal Chemistry* 44, 1341-1348.
 47. Krauss, U., Kratz, F., and Beck-Sickinger, A. G. (2003) Novel daunorubicin-carrier peptide conjugates derived from human calcitonin segments, *Journal of Molecular Recognition* 16, 280-287.

48. Rodrigues, P. C. A., Roth, T., Fiebig, H. H., Unger, C., Mulhaupt, R., and Kratz, F. (2006) Correlation of the acid-sensitivity of polyethylene glycol daunorubicin conjugates with their in vitro antiproliferative activity, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 14, 4110-4117.
49. Nogusa, H., Hamana, H., Uchida, N., Maekawa, R., and Yoshioka, T. (2000) Improved in vivo antitumor efficacy and reduced systemic toxicity of carboxymethylpullulan-peptide-doxorubicin conjugates, *Japanese Journal of Cancer Research* 91, 1333-1338.
50. Masquelier, M., Baurain, R., and Trouet, A. (1980) Amino-acid and dipeptide derivatives of daunorubicin. 1. synthesis, physicochemical properties, and lysosomal digestion, *Journal of Medicinal Chemistry* 23, 1166-1170.
51. Wong, B. K., Defeo-Jones, D., Jones, R. E., Garsky, V. M., Feng, D. M., Oliff, A., Chiba, M., Ellis, J. D., and Lin, J. H. (2001) PSA-specific and non-PSA-specific conversion of a PSA-targeted peptide conjugate of doxorubicin to its active metabolites, *Drug Metabolism and Disposition* 29, 313-318.
52. Shen, W. C., and Ryser, H. J. P. (1981) Cis-aconityl spacer between daunomycin and macromolecular carriers - a model of pH-sensitive linkage releasing drug from a lysosomotropic conjugate, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 102, 1048-1054.
53. Hudecz, F., Clegg, J. A., Kajtar, J., Embleton, M. J., Szekerke, M., and Baldwin, R. W. (1992) Synthesis, conformation, biodistribution, and in vitro cytotoxicity of daunomycin branched polypeptide conjugates, *Bioconjugate Chemistry* 3, 49-57.
54. Rousselle, C., Clair, P., Lefauconnier, J. M., Kaczorek, M., Scherrmann, J. M., and Tamsamani, J. (2000) New advances in the transport of doxorubicin through the blood-brain barrier by a peptide vector-mediated strategy, *Molecular Pharmacology* 57, 679-686.
55. Trouet, A., Masquelier, M., Baurain, R., and Deprezdecampeneere, D. (1982) A covalent linkage between daunorubicin and proteins that is stable in serum and reversible by lysosomal hydrolases, as required for a lysosomotropic drug-carrier conjugate - in vitro and in vivo studies, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* 79, 626-629.
56. Arnold, L. J. (1985) Polylysine—drug conjugates, *Methods in Enzymology* 112, 270-285.
57. Taatjes, D. J., Fenick, D. J., and Koch, T. H. (1999) Nuclear targeting and nuclear retention of anthracycline-formaldehyde conjugates implicates DNA covalent bonding in the cytotoxic mechanism of anthracyclines, *Chemical Research in Toxicology* 12, 588-596.
58. Kasiotis, K. M., Magiatis, P., Pratsinis, H., Skaltsounis, A. L., Abadji, V., Charalambous, A., Moutsatsou, P., and Haroutounian, S. A. (2001) Synthesis and biological evaluation of novel daunorubicin-estrogen conjugates, *Steroids* 66, 785-791.
59. Tevyashova, A., Sztaricskai, F., Batta, G., Herczegh, P., and Jeney, A. (2004) Formation of squaric acid amides of anthracycline antibiotics. Synthesis and cytotoxic properties, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 14, 4783-4789.
60. Shabat, D., Rader, C., List, B., Lerner, R. A., and Barbas, C. F. (1999) Multiple event activation of a generic prodrug trigger by antibody catalysis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 6925-6930.
61. Yamamoto, K., Acton, E. M., and Henry, D. W. (1972) Antitumor activity of some derivatives of daunorubicin at the amino and methyl ketone functions, *Journal of Medicinal Chemistry* 15, 872-875.

-
62. Griffiths, G. L., Mattes, M. J., Stein, R., Govindan, S. V., Horak, I. D., Hansen, H. J., and Goldenberg, D. M. (2003) Cure of SCID mice bearing human B-lymphoma xenografts by an Anti-CD74 antibody-anthracycline drug conjugate, *Clinical Cancer Research* 9, 6567-6571.
 63. Ingallinella, P., Di Marco, A., Taliani, M., Fattori, D., and Pessi, A. (2001) A new method for chemoselective conjugation of unprotected peptides to dauno- and doxorubicin, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 11, 1343-1346.
 64. Capobianco, M. L., De Champdore, M., Arcamone, F., Garbesi, A., Gulancvar'h, D., and Arimondo, P. B. (2005) Improved synthesis of daunomycin conjugates with triplex-forming oligonucleotides. The polypurine tract of HIV-1 as a target, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 13, 3209-3218.
 65. Horton, D., Priebe, W., and Sznajdman, M. (1988) Preparative procedures for conversion of daunorubicin into doxorubicin (adriamycin) and 14-O-acetyldoxorubicin by way of 14-bromodaunorubicin, *Carbohydrate Research* 184, 231-235.
 66. Meyer-Losic, F., Quinonero, J., Dubois, V., Alluis, B., Dechambre, M., Michel, M., Cailler, F., Fernandez, A. M., Trouet, A., and Kearsy, J. (2006) Improved therapeutic efficacy of doxorubicin through conjugation with a novel peptide drug delivery technology (Vectocell), *Journal of Medicinal Chemistry* 49, 6908-6916.
 67. Wilson, D. W., Grier, D., Reimer, R., Bauman, J. D., Preston, J. F., and Gabbay, E. J. (1976) Structure-activity relationship of daunorubicin and its peptide derivatives, *Journal of Medicinal Chemistry* 19, 381-384.
 68. Remenyi, J., Csik, G., Kovacs, P., Reig, F., and Hudecz, F. (2006) The effect of the structure of branched polypeptide carrier on intracellular delivery of daunomycin, *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes* 1758, 280-289.
 69. Versluis, A. J., Rump, E. T., Rensen, P. C. N., Van Berkel, T. J. C., and Bijsterbosch, M. K. (1998) Synthesis of a lipophilic daunorubicin derivative and its incorporation into lipidic carriers developed for LDL receptor-mediated tumor therapy, *Pharmaceutical Research* 15, 531-537.
 70. Moon, C., Kwon, Y. M., Lee, W. K., Park, Y. J., and Yang, V. C. (2007) In vitro assessment of a novel polyrotaxane-based drug delivery system integrated with a cell-penetrating peptide, *Journal of Controlled Release* 124, 43-50.
 71. Bánóczy, Z., Peregi, B., Orbán, E., Szabó, R., and Hudecz, F. (2008) Synthesis of daunomycin-oligoarginine conjugates and their effect on human leukemia cells (HL-60), *Arkivoc*, 140-153.
 72. Miklán, Z., Orbán, E., Csik, G., Schlosser, G., Magyar, A., and Hudecz, F. (2009) New daunomycin - oligoarginine conjugates: Synthesis, characterization and effect on human leukemia and human hepatoma cells, *Biopolymers* 92, 489-501.
 73. Adjei, A. A. (2000) Pemetrexed: A multitargeted antifolate agent with promising activity in solid tumors, *Annals of Oncology* 11, 1335-1341.
 74. Walling, J. (2006) From methotrexate to pemetrexed and beyond. A review of the pharmacodynamic and clinical properties of antifolates., *Investigational New Drugs* 24, 37-77.
 75. Paz-Ares, L., Bezares, S., Tabernero, J. M., Castellanos, D., and Cortes-Funes, H. (2003) Review of a promising new agent - Pemetrexed disodium, *Cancer* 97, 2056-2063.
 76. Miller, K. D., Picus, J., Blanke, C., John, W., Clark, J., Shulman, L. N., Thornton, D., Rowinsky, E., and Loehrer, P. J. (2000) Phase II study of the multitargeted antifolate LY231514 (ALIMTA (TM), MTA, pemetrexed disodium) in patients with advanced pancreatic cancer, *Annals of Oncology* 11, 101-103.

77. Clarke, S. J., Abratt, R., Goedhals, L., Boyer, M. J., Millward, M. J., and Ackland, S. P. (2002) Phase II trial of pemetrexed disodium (ALIMTA((R))), LY231514) in chemotherapy-naïve patients with advanced non-small-cell lung cancer, *Annals of Oncology* 13, 737-741.
78. Llombart-Cussac, A., Martin, M., Harbeck, N., Anghel, R. M., Eniu, A. E., Verrill, M. W., Neven, P., De Greve, J., Melemed, A. S., Clark, R., Simms, L., Kaiser, C. J., and Ma, D. (2007) A randomized, double-blind, phase II study of two doses of pemetrexed as first-line chemotherapy for advanced breast cancer, pp 3652-3659.
79. Bearz, A., Garassino, I., Cavina, R., Favaretto, A., Boccalon, M., Talamini, R., Berretta, M., Spazzapan, S., Simonelli, C., Santoro, A., and Tirelli, U. (2008) Pemetrexed single agent in previously treated non-small cell lung cancer: A multi-institutional observational study, *Lung Cancer* 60, 240-245.
80. Manegold, C., Gatzemeier, U., von Pawel, J., Pirker, R., Malayeri, R., Blatter, J., and Krejcy, K. (2000) Front-line treatment of advanced non-small-cell lung cancer with MTA (LY231514, Pemetrexed disodium, ALIMTA (TM)) and cisplatin: A multicenter phase II trial, *Annals of Oncology* 11, 435-440.
81. Castagneto, B., Botta, M., Aitini, E., Spigno, F., Degiovanni, D., Alabiso, O., Serra, M., Muzio, A., Carbone, R., Buosi, R., Galbusera, V., Piccolini, E., Giarretto, L., Rebella, L., and Mencoboni, M. (2008) Phase II study of pemetrexed in combination with carboplatin in patients with malignant pleural mesothelioma (MPM), *Annals of Oncology* 19, 370-373.
82. Garin, A., Manikhas, A., Biakhov, M., Chezhin, M., Ivanchenko, T., Krejcy, K., Karaseva, V., and Tjulandin, S. (2008) A phase II study of pemetrexed and carboplatin in patients with locally advanced or metastatic breast cancer, *Breast Cancer Research and Treatment* 110, 309-315.
83. Stover, D. G., Lockhart, A. C., Berlin, J. D., Chan, E., Sandler, A. B., Sosman, J. A., Middlebrook, V., Nicol, S., and Rothenberg, M. L. (2008) Phase I trial of pemetrexed plus oxaliplatin administered every other week in patients with metastatic cancer, *Investigational New Drugs* 26, 339-345.
84. Li, T. H., Ling, Y. H., Goldman, I. D., and Perez-Soler, R. (2007) Schedule-dependent cytotoxic synergism of pemetrexed and erlotinib in human non-small cell lung cancer cells, *Clinical Cancer Research* 13, 3413-3422.
85. Kindler, H. L. (2002) The pemetrexed/gemcitabine combination in pancreatic cancer, *Cancer* 95, 928-932.
86. Dreicer, R., Li, H. L., Cooney, M. M., Wilding, G., and Roth, B. J. (2008) Phase 2 trial of pemetrexed disodium and gemcitabine in advanced urothelial cancer (E4802) - A trial of the Eastern Cooperative Oncology Group, *Cancer* 112, 2671-2675.
87. Adjei, A. A. (2004) Pemetrexed (ALIMTA), a novel multitargeted antineoplastic agent, *Clinical Cancer Research* 10, 4276S-4280S.
88. Stathopoulos, G. P., Dimitroulis, J., Toubis, M., Katis, C., Karaindros, D., Stathopoulos, J., and Koutandos, J. (2007) Pemetrexed combined with paclitaxel in patients with advanced or metastatic non-small-cell lung cancer: A phase I-II trial, *Lung Cancer* 57, 66-71.
89. Li, Q., Yano, S., Ogino, H., Wang, W., Uehara, H., Nishioka, Y., and Sone, S. (2007) The therapeutic efficacy of anti-vascular endothelial growth factor antibody, bevacizumab, and pemetrexed against orthotopically implanted human pleural mesothelioma cells in severe combined immunodeficient mice, *Clinical Cancer Research* 13, 5918-5925.

90. Bischof, M., Weber, K. J., Blatter, J., Wannenmacher, M., and Latz, D. (2002) Interaction of pemetrexed disodium (Alimta, multitargeted antifolate) and irradiation in vitro, *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* 52, 1381-1388.
91. Carteni, G., Manegold, C., Garcia, G. M., Siena, S., Zielinski, C. C., Amadori, D., Liu, Y., Blatter, J., Visseren-Grul, C., and Stahel, R. (2009) Malignant peritoneal mesothelioma-Results from the International Expanded Access Program using pemetrexed alone or in combination with a platinum agent, *Lung Cancer* 64, 211-218.
92. Cullen, M. H., Zatloukal, P., Sorenson, S., Novello, S., Fischer, J. R., Joy, A. A., Zereu, M., Peterson, P., Visseren-Grul, C. M., and Iscoe, N. (2008) A randomized phase III trial comparing standard and high-dose pemetrexed as second-line treatment in patients with locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer, *Annals of Oncology* 19, 939-945.
93. Hanauske, A. R., Endler, C., Graefe, T., Fleeth, J., von Scheel, J., Ludtke, F. E., Muller-Hagen, S., Depenbrock, H., Ohnmacht, U., and Bolling, C. (2008) Phase-I-study of four different schedules of pemetrexed, gemcitabine and cisplatin in patients with locally advanced or metastatic solid tumours, *European Journal of Cancer* 44, 2444-2452.
94. Kulkarni, P. M., Chen, R. Q., Anand, T., Monberg, M. J., and Obasaju, C. K. (2008) Efficacy and safety of pemetrexed in elderly cancer patients: Results of an integrated analysis, *Critical Reviews in Oncology Hematology* 67, 64-70.
95. De Marinis, F., De Santis, S., and De Petris, L. (2006) Second-line chemotherapy for non-small cell lung cancer, pp V68-V71.
96. Scagliotti, G., Hanna, N., Fossella, F., Sugarman, K., Blatter, J., Peterson, P., Simms, L., and Shepherd, F. A. (2009) The Differential Efficacy of Pemetrexed According to NSCLC Histology: A Review of Two Phase III Studies, *Oncologist* 14, 253-263.
97. Marangolo, M., and Vertogen, B. (2006) Pemetrexed and malignant pleural mesothelioma, pp V103-V105.
98. Li, L., Razak, A. R. A., and Hughes, A. (2009) Carboplatin and pemetrexed in the management of malignant pleural mesothelioma: A realistic treatment option?, *Lung Cancer* 64, 207-210.
99. Stahel, R. A., Weder, W., Felip, E., and Grp, E. G. W. (2009) Malignant pleural mesothelioma: ESMO Clinical Recommendations for diagnosis, treatment and follow-up, *Annals of Oncology* 20, 73-75.
100. Perabo, F. G. E., and Muller, S. C. (2007) New agents for treatment of advanced transitional cell carcinoma, *Annals of Oncology* 18, 835-843.
101. Miles, D. W., Smith, I. E., Coleman, R. E., Calvert, A. H., and Lind, M. J. (2001) A phase II study of pemetrexed disodium (LY231514) in patients with locally recurrent or metastatic breast cancer, *European Journal of Cancer* 37, 1366-1371.
102. Derossi, D., Joliet, A. H., Chassaing, G., and Prochiantz, A. (1994) The 3rd helix of the antennapedia homeodomain translocates through biological-membranes, *Journal of Biological Chemistry* 269, 10444-10450.
103. Fawell, S., Seery, J., Daikh, Y., Moore, C., Chen, L. L., Pepinsky, B., and Barsoum, J. (1994) Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 664-668.

104. Mitchell, D. J., Kim, D. T., Steinman, L., Fathman, C. G., and Rothbard, J. B. (2000) Polyarginine enters cells more efficiently than other polycationic homopolymers, *Journal of Peptide Research* 56, 318-325.
105. Wender, P. A., Mitchell, D. J., Pattabiraman, K., Pelkey, E. T., Steinman, L., and Rothbard, J. B. (2000) The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: Peptoid molecular transporters, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 13003-13008.
106. Futaki, S., Suzuki, T., Ohashi, W., Yagami, T., Tanaka, S., Ueda, K., and Sugiura, Y. (2001) Arginine-rich peptides - An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery, *Journal of Biological Chemistry* 276, 5836-5840.
107. Patel, L. N., Zaro, J. L., and Shen, W. C. (2007) Cell penetrating peptides: Intracellular pathways and pharmaceutical perspectives, *Pharmaceutical Research* 24, 1977-1992.
108. Nakase, I., Takeuchi, T., Tanaka, G., and Futaki, S. (2008) Methodological and cellular aspects that govern the internalization mechanisms of arginine-rich cell-penetrating peptides, *Advanced Drug Delivery Reviews* 60, 598-607.
109. Hudecz, F., Banoczy, Z., and Csik, G. (2005) Medium-sized peptides as built in carriers for biologically active compounds, *Medicinal Research Reviews* 25, 679-736.
110. Foged, C., and Nielsen, H. M. (2008) Cell-penetrating peptides for drug delivery across membrane barriers, *Expert Opinion in Drug Delivery* 5, 105-117.
111. Kirschberg, T. A., VanDeusen, C. L., Rothbard, J. B., Yang, M., and Wender, P. A. (2003) Arginine-based molecular transporters: The synthesis and chemical evaluation of releasable taxol-transporter conjugates, *Organic Letters* 5, 3459-3462.
112. Viht, K., Padari, K., Raidaru, G., Subbi, J., Tatumiste, I., Pooga, M., and Uri, A. (2003) Liquid-phase synthesis of a pegylated adenosine-oligoarginine conjugate, cell-permeable inhibitor of cAMP-dependent protein kinase, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 13, 3035-3039.
113. Rothbard, J. B., Garlington, S., Lin, Q., Kirschberg, T., Kreider, E., McGrane, P. L., Wender, P. A., and Khavari, P. A. (2000) Conjugation of arginine oligomers to cyclosporin A facilitates topical delivery and inhibition of inflammation, *Nature Medicine* 6, 1253-1257.
114. Richard, J. P., Melikov, K., Vives, E., Ramos, C., Verbeure, B., Gait, M. J., Chernomordik, L. V., and Lebleu, B. (2003) Cell-penetrating peptides - A reevaluation of the mechanism of cellular uptake, *Journal of Biological Chemistry* 278, 585-590.
115. Yang, L. L., Mashima, T., Sato, S., Mochizuki, M., Sakamoto, H., Yamori, T., Oh-hara, T., and Tsuruo, T. (2003) Predominant suppression of apoptosome by inhibitor of apoptosis protein in non-small cell lung cancer H460 cells: Therapeutic effect of a novel polyarginine-conjugated Smac peptide, *Cancer Research* 63, 831-837.
116. Allen, M. J., MacRenaris, K. W., Venkatasubramanian, P. N., and Meade, T. J. (2004) Cellular delivery of MRI contrast agents, *Chemistry & Biology* 11, 301-307.
117. Fischer, R., Kohler, K., Fotin-Mleczek, M., and Brock, R. (2004) A stepwise dissection of the intracellular fate of cationic cell-penetrating peptides, *Journal of Biological Chemistry* 279, 12625-12635.

118. Yang, S. R., Kim, S. B., Joe, C. O., and Kim, J. D. (2005) Self-aggregates of oligoarginine-conjugated poly(amino acid) derivatives as a carrier for intracellular drug delivery, *Biotechnology Letters* 27, 977-982.
119. Zaro, J. L., and Shen, W. C. (2005) Cytosolic delivery of a p16-peptide oligoarginine conjugate for inhibiting proliferation of MCF7 cells, *Journal of Controlled Release* 108, 409-417.
120. Choi, H. S., Kim, H. H., Yang, J. M., and Shin, S. (2006) An insight into the gene delivery mechanism of the arginine peptide system: Role of the peptide/DNA complex size, *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* 1760, 1604-1612.
121. Khalil, I. A., Kogure, K., Futaki, S., Hama, S., Akita, H., Ueno, M., Kishida, H., Kudoh, M., Mishina, Y., Kataoka, K., Yamada, M., and Harashima, H. (2007) Octaarginine-modified multifunctional envelope-type nanoparticles for gene delivery, *Gene Therapy* 14, 682-689.
122. Morishita, M., Kamei, N., Ehara, J., Isowa, K., and Takayama, K. (2007) A novel approach using functional peptides for efficient intestinal absorption of insulin, *Journal of Controlled Release* 118, 177-184.
123. Rawat, A., Yang, T. Z., Hussain, A., and Ahsan, F. (2008) Complexation of a poly-L-arginine with low molecular weight heparin enhances pulmonary absorption of the drug, *Pharmaceutical Research* 25, 936-948.
124. Kogure, K., Akita, H., Yamada, Y., and Harashima, H. (2008) Multifunctional envelope-type nano device (MEND) as a non-viral gene delivery system, *Advanced Drug Delivery Reviews* 60, 559-571.
125. Kosuge, M., Takeuchi, T., Nakase, I., Jones, A. T., and Futaki, S. (2008) Cellular internalization and distribution of arginine-rich peptides as a function of extracellular peptide concentration, serum, and plasma membrane associated proteoglycans, *Bioconjugate Chemistry* 19, 656-664.
126. Fukuda, M. N., Ohyama, C., Lowitz, K., Matsuo, O., Pasqualini, R., Ruoslahti, E., and Fukuda, M. (2000) A peptide mimic of E-selectin ligand inhibits sialyl Lewis X-dependent lung, *Cancer Research* 60, 450-456.
127. Fukuda, M. N. (2006) Amplifiable carbohydrate mimics provided by peptide-displaying phage, *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* 18, 147-151.
128. Ohyama, C., Kanto, S., Kato, K., Nakano, O., Aral, Y., Kato, T., Chen, S., Fukuda, M. N., and Fukuda, M. (2002) Natural killer cells attack tumor cells expressing high levels of sialyl Lewis x oligosaccharides, *PNAS* 99, 13789-13794.
129. Zhang, J., Nakayama, J., Ohyama, C., Suzuki, M., Suzuki, A., Fukuda, M., and Fukuda, M. N. (2002) Sialyl Lewis X-dependent lung colonization of B16 melanoma cells through a selectin-like endothelial receptor distinct from E- or P-selectin, *Cancer Research* 62, 4194-4198.
130. Hildebrandt, N., Hermsdorf, D., Signorelli, R., Schmitz, S. A., and Diederichsen, U. (2007) Superparamagnetic iron oxide nanoparticles functionalized with peptides by electrostatic interactions, *Arkivoc* v, 79-90.
131. Kaiser, E., Colese, R. L., Bossinger, C. D., and I., C. P. (1970) Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides, *Analytical Biochemistry* 34, 595-598.
132. Arndt, F. (1943) Diazomethane, In *Organic Synthesis, Collective Volume 2* (Blatt, A. H., Ed.), pp 165-167, Wiley, John & Sons, Incorporated.
133. Csámpai, A., Jalsovszky, I., Majer, Z., Orosz, G., Rábai, J., Ruff, F., and Sebestyén, F. (1998) *Szerves Kémiai Praktikum*, Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest, Hungary.

134. Tietze, L. F., Arlt, M., Beller, M., Glüsenkamp, K. H., Jäde, E., and Rajewsky, M. F. (1991) Squaric acid diethyl ester: a new coupling reagent for the formation of drug biopolymer conjugates. Synthesis of squaric acid ester amides and diamides., *Chemische Berichte* 124, 1215-1221.
135. Schmidt, A. H. (1980) Reaktionen von Quadratsäure und Quadratsäure-Derivaten, *Synthesis* 1980, 961-994.
136. Shao, J., and Tam, J. P. (1995) Unprotected peptides as building blocks for the synthesis of peptide dendrimers with oxime, hydrazone, and thiazolidine linkages, *Journal of the American Chemical Society* 117, 3893-3899.

7. Összefoglaló

A tumor ellenes hatással rendelkező és klinikailag alkalmazott vegyületek vagy új hatóanyag jelöltek hatékonyságának növelése, az aktivitásuk fokozásával vagy mellékhatásaik mérséklésével, napjainkban is fontos feladat. Doktori munkám során tumor ellenes hatással rendelkező vegyületek konjugátumait állítottam elő az ismert, sejtpenetráló oligoarginin peptidekkel. Választ kerestem arra, hogy a konjugálás milyen módon változtathatja meg az alapvegyület fizikai-kémiai és biológiai tulajdonságait. Előállítottam olyan konjugátumokat melyekben a biológiai aktivitásért felelős molekularészlet az új származékban is szabadon marad.

A ferrocén-karbonsavat és ferrocén-akrilsavat – a ferrocén részletet tartalmazó tumor ellenes szerek modell vegyületeit – tetra-, hexa- és oktaarginin peptidekhez kapcsoltam szilárdfázison vagy folyadékfázisban, amid kötés kialakításával. A konjugátumok vízdoldhatóvá válásán túl a ferrocén-karbonsav esetében a hexa- és oktaarginin származékok megnövekedett citosztatikus aktivitását figyeltük meg HL-60 sejteken. A ferrocén-akrilsav citosztatikus hatásán azonban nem javított az oligoargininnel való konjugálás.

A daunomicint – az antraciklin típusú tumor ellenes szerek alapvegyületét – különböző kémiai technikákat alkalmazva kapcsoltam tetra-, hexa- és oktaarginin peptidekhez. A daunomicin glükózamino-csoportján négyzsógsavamid, az oxo-csoportján pedig oxim valamint hidrazon kötést alakítottam ki. A konjugátumok citosztatikus hatása a daunomicin hatásához képest mérséklődött, a leghatékonyabb származékok az oxo-csoporton kapcsolt tetraarginin, valamint az oxim kötést tartalmazó hexaarginin konjugátumok voltak.

A pemetrexedet – az antimetabolitok közé tartozó újonnan fejlesztett folsav antagonistá vegyületet – oktaargininhez, egy tüdőbe juttató peptidhez (IELLQAR) és egy mindkét szekvenciát tartalmazó peptidhez konjugáltam. A pemetrexed heteroaromás aminos-csoportjához klóracetil-csoportot kapcsoltam, míg a peptid szekvenciákba ciszteint építettem be és tioéter kötés kialakításával állítottam elő az új származékokat. A konjugátumok megőrizték a pemetrexed citosztatikus aktivitását, hatásuk csupán mérsékelten csökkent. Az IELLQAR szekvenciát tartalmazó származékok bizonyultak hatékonyabbnak.

8. Abstract

Further improvement of clinically applied or newly developed antitumor compounds – with increasing their activity or decreasing their side-effects – is still an important task for biomedicinal chemistry. During my doctoral work I have prepared conjugates of antitumor agents with cell-penetrating oligoarginine peptides. I was interested in the investigation of the effect of conjugation on changes in the physical-chemical and biological properties of the compounds. I have prepared conjugates in which the chemical moiety responsible for the biological activity of the molecule was preserved.

I have coupled ferrocene-carboxylic acid and ferrocene-acrylic acid – the model compounds of antitumor drugs containing ferrocene moiety – to tetra-, hexa- and octaarginine peptides on solid phase or in solution. The reaction resulted amide bond between the partners. I observed, besides the increasing water solubility of all the conjugates, increasing cytostatic activity of hexa- and octaarginine conjugates of ferrocene-carboxylic acid on human leukaemia (HL-60) cells. However, the cytostatic activity of ferrocene-acrylic acid was not elevated by the conjugation with oligoarginine.

I have coupled daunomycin – the key compound of anthracycline type antitumor drugs – to tetra-, hexa- and octaarginine peptide applying different chemical strategies. At the glucose-amino-group of daunomycin squaric amid bond, at the oxo-group oxim or hydrazone bond were formed. The cytostatic activity of the conjugates was moderated as compared to the effect of free daunomycin. The tetraarginine derivatives coupled at the oxo-group and the hexaarginine derivative containing oxim bond were the most effective conjugates.

I have conjugated pemetrexed – the newly developed folic acid antagonist, an antimetabolite – to octaarginine, to a lung targeting peptide (IELLQAR) and to a peptide containing both sequences. I have modified the heteroaromatic amino-group of pemetrexed by a chloroacetyl-group, while I have incorporated cysteine into the peptide sequences, then I have synthesized the conjugates. The reaction resulted thioether bond between the partners. The conjugates have essentially preserved the cytostatic activity of pemetrexed, their effect were only slightly decreased. The derivatives containing IELLQAR sequence were proved to be the more effective.